



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Levaduras con potencial de remediación de 2,4,6 -
trinitrotolueno (TNT) y evaluación de su capacidad
degradativa**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga y
Parasitóloga

AUTOR

Mesalina Violeta PECEROS MELCHOR

ASESOR

Dr. Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Peceros, M. (2019). *Levaduras con potencial de remediación de 2,4,6 - trinitrotolueno (TNT) y evaluación de su capacidad degradativa*. Tesis para optar el título profesional de Bióloga Microbióloga y Parasitóloga. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

CODIGO ORCID DEL AUTOR: 0000-0002-2180-9429

CODIGO ORCID DEL ASESOR: 0000-0001-9309-7021

DNI DEL AUTOR: 44647227

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: NO PERTENECE

INTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA
INVESTIGACIÓN: AUTOFINANCIAMIENTO

UBLICACIÓN GEOGRAFICA DONDE SE DESARROLLO LA
INVESTIGACIÓN. DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS
GEOGRÁFICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS – LABORATORIO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA, UNMSM

LATITUD: -12.059685

LONGITUD: -77.082148

AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:

2013-2015



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 15:00 horas del 23 de enero de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga de **MESALINA VIOLETA PECEROS MELCHOR**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 020-EPMP-2018, el titulando expuso su tesis: **"LEVADURAS CON POTENCIAL DE REMEDIACIÓN DE 2,4,6-TRINITROTOLUENO (TNT) Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD DEGRADATIVA"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19....., calificativo: Aprobado con máximos honores....

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **MESALINA VIOLETA PECEROS MELCHOR** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 16:45 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 23 de enero de 2019.

Mg. ELENA QUILLAMA POLO
(PRESIDENTE)

Dr. PABLO RAMIREZ ROCA
(ASESOR)

Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL
(MIEMBRO)

Mg. MARIO ALCARRAZ CURI
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

*A mis Padres Lucía y Raúl, quienes me apoyaron, educaron y alentaron,
dándome la oportunidad de crecer; a mis hermanos Nancy, Cleofé y
Raúl, por su paciencia y comprensión. Los amo.*

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Pablo Ramírez, quien confió en mí, me apoyó, y me dio todas las facilidades para la culminación de mi tesis. Gracias por guiarme, escucharme, asesorarme y creer en mí. A mis amigos, quienes me apoyaron en todo momento; gracias por estar a mi lado.

A mi familia, por el apoyo incondicional.

ÍNDICE

	Pág.
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS	4
VARIABLES	5
CAPÍTULO II	6
MARCO TEÓRICO	6
2.1. 2,4,6-trinitrotolueno (TNT).....	6
2.2. Contaminación ambiental por 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)	7
2.3. Toxicidad de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)	9
2.4. Bioremediación de TNT.....	10
2.5. Vías de biodegradación en condiciones aeróbicas	11
2.5.1. Reducción del grupo nitro del TNT	11
2.5.2. Reducción del anillo aromático del TNT	13
2.6. Determinación de trinitrotolueno por método espectrofotométrico ...	16
CAPÍTULO III	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Materiales	18
3.2. Metodología	18
3.2.1. Reactivación de material biológico	18
3.2.2. Evaluación de tolerancia de cepas de levaduras al TNT	18
3.2.3. Identificación Molecular.....	20
3.2.4. Evaluación de la remoción de TNT por levaduras	22
3.2.4.1. Remoción de TNT por levaduras tolerantes.....	22
3.2.4.2. Efecto de factores en la capacidad degradadora de TNT.....	22
3.2.5. Procedimiento analítico	23
3.2.5.1. Análisis de crecimiento celular	23
3.2.5.2. Determinación de TNT	24
3.2.5.3. Determinación de nitrito (NO ₂ ⁻).....	25

CAPÍTULO IV	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Evaluación de tolerancia de cepas de levaduras al TNT	26
4.2. Identificación Molecular	32
4.3. Evaluación de la remoción de TNT por levaduras tolerantes	35
4.3.2. Cinética de degradación de TNT	41
4.3.3. Crecimiento celular de levaduras	45
4.3.4. Determinación de nitrito durante la degradación de TNT	48
4.4. Efecto de factores en la capacidad degradadora de TNT	54
4.4.2. Análisis de varianza (ANOVA).....	57
4.4.3. Efectos de factores en la degradación de TNT	59
4.5. Degradación de TNT por la cepa MD10-A3 en condiciones óptimas	64
CAPÍTULO V	68
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	70
ANEXO	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT).....	6
Figura 2. Destino ambiental de explosivo TNT y su circulación a través de campos agrícolas y cuerpos de agua (Chatterjee et al., 2017).	8
Figura 3. Transformación de TNT vía reducción del grupo nitro (Claus, 2014).	12
Figura 4. Reacción de condensación de los compuestos nitrosodinitrotoluenos (NO-DNT) y hidroxilaminodinitrotoluenos HADNT (Pannier, 2009).	13
Figura 5. Formación del complejo C-3-H ⁻ -TNT a partir de TNT (Claus, 2014).	14
Figura 6. Esquema que ilustra las principales vías y las enzimas clave reguladas en la transformación de TNT por <i>Y. lipolytica</i> (Khilyas et al., 2017).	16
Figura 7. Crecimiento de 29 cepas de levaduras frente a diferentes concentraciones de TNT.....	27
Figura 8. Morfología de la cepa <i>Candida orthopsilosis</i> 8TS-500Z mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).	32
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del amplificado por PCR de la región D1/D2 del gen LSU 28S rDNA LSU.	33
Figura 10. Árbol filogenético NJ de las cepas basado en la secuencia del gen 28S de levaduras ascomicetas. Los valores de <i>Bootstrap</i> son mostrados como porcentaje de 1000 réplicas en el punto de ramificación.....	35
Figura 11. Unidades experimentales en la remoción de TNT a 200 mg/L, en medio de cultivo sintético a pH 6.5, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C por 84 horas.	37
Figura 12. Regresión lineal de la curva de calibración de TNT.	39
Figura 13. Porcentaje de remoción de TNT a 200 mg/L, en medio de cultivo sintético a pH 6.5, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C por 84 horas.....	41
Figura 14. Remoción de TNT a 200 mg/L, en medio de cultivo sintético a pH 6.5, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C por 84 horas.	43
Figura 15. Cambios en el crecimiento celular después del periodo de incubación, en medio de cultivo sintético con 200 mg/L de TNT a pH 6.5, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C por 84 horas.	46

Figura 16. Liberación del ión nitrito (NO_2^-) durante la degradación de TNT por cinco cepas de levaduras. Medio de cultivo sintético con 200 mg/L de TNT a pH 6.5, 120 rpm y $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$ por 84 horas.	49
Figura 17. Remoción de TNT por la cepa <i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3 en medio sintético a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$. Constantes de velocidad $k_1 = 0.0159\text{ h}^{-1}$, $k_2 = 0.0001\text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y $\mu = 0.0136\text{ h}^{-1}$	51
Figura 18. Remoción de TNT por la cepa <i>Candida maltosa</i> MD3-S1 en medio sintético a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$. Constantes de velocidad $k_1 = 0.0173\text{ h}^{-1}$, $k_2 = 0.0001\text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y $\mu = 0.0122\text{ h}^{-1}$	52
Figura 19. Remoción de TNT por la cepa <i>Candida maltosa</i> MD10-A1 en medio sintético a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$. Constantes de velocidad $k_1 = 0.0104\text{ h}^{-1}$, $k_2 = 0.0001\text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y $\mu = 0.0042\text{ h}^{-1}$	52
Figura 20. Remoción de TNT por la cepa <i>Candida orthopsilosis</i> 8TS-500-1 en medio sintético a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$. Constantes de velocidad $k_1 = 0.0071\text{ h}^{-1}$, $k_2 = 0.0001\text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y $\mu = 0.0021\text{ h}^{-1}$	53
Figura 21. Remoción de TNT por la cepa <i>Yarrowia lipolytica</i> 9TS-500-1 (identificada por Medina Canzio (2009)) en medio sintético a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$. Constantes de velocidad $k_1 = 0.0080\text{ h}^{-1}$, $k_2 = 0.0001\text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y $\mu = 0.0058\text{ h}^{-1}$	53
Figura 22. Unidades experimentales establecidas por el método DFF, 2^{5-1} , para cinco factores, en la remoción de TNT a 200 mg/L, 120 rpm y $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$, por la cepa <i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3 a las 0 h.....	56
Figura 23. Unidades experimentales establecidas por el método DFF, 2^{5-1} , para cinco factores, en la remoción de TNT a 200 mg/L, 120 rpm y $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$, por la cepa <i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3 a las 36 h.....	56
Figura 24. Unidades experimentales establecidas por el DFF, 2^{5-1} , para cinco factores, en la remoción de TNT a 200 mg/L, 120 rpm y $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$, por la cepa <i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3 a las 72 h.	57
Figura 25. Diagrama de Pareto para el DFF (2^{5-1}) para cinco factores: glucosa, NH_4Cl , tween 80, pH e inóculo, afectando la remoción de TNT por la cepa <i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3..	59

Figura 26. Efectos principales en el porcentaje de eficiencia de remoción de TNT por la cepa <i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3..	61
Figura 27. Efecto de la interacción de factores en el porcentaje de eficiencia de remoción de TNT por la cepa <i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3. (- nivel menor y + nivel mayor).....	62
Figura 28. Remoción de TNT por la cepa <i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3 en medio óptimo a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C.	65
Figura 29. Remoción de TNT por la cepa <i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3 en medio óptimo (línea continua) y medio no óptimo (línea punteada), a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C.....	66
Figura 30. Ajuste de modelos cinéticos en la remoción de TNT por la cepa <i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3 en medio óptimo (cuadrado) y medio no óptimo (circulo), a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C..	67
Figura 31. Efectos principales en la liberación de nitrito.	79
Figura 32. Curva de calibración de nitrito.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Descripción de variables independientes y dependientes.....	5
Tabla 2. Matriz de factores y niveles con su codificación.....	23
Tabla 3. Morfología de cepas de levaduras mediante microscopía óptica, técnica de tinción Gram.....	30
Tabla 4. Morfología de cepas de levaduras mediante microscopía óptica, técnica de tinción Gram. Continuación.	31
Tabla 5. Especies y porcentaje de identidad a nivel molecular de las cepas de levaduras seleccionadas.	34
Tabla 6. Modelos cinéticos de degradación de TNT por cinco cepas de levaduras.	44
Tabla 7. Evaluación de la tasa de crecimiento específico, tiempo de duplicación y número de generaciones.	48
Tabla 8. Matriz de respuesta de efecto de factores en la degradación de TNT.	55
Tabla 9. Resultados ANOVA para todos los efectos incorporados.....	58
Tabla 10. Valores óptimos en cinco factores.....	64
Tabla 11. Parámetros constantes de modelos cinéticos para la remoción de TNT por la cepa <i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3.	67
Tabla 12. Tolerancia de 29 cepas de levaduras a TNT.....	78
Tabla 13. Análisis ANOVA de respuesta liberación de nitrito durante la degradación de TNT.....	79
Tabla 14. Datos de curva de calibración de TNT.	80
Tabla 15. ANOVA de calibración de TNT.....	80
Tabla 16. ANOVA de calibración de nitrito.....	81

RESUMEN

El 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) es un explosivo nitroaromático que, al ser liberado al ambiente, genera riesgos tóxicos y mutagénicos. Por lo tanto, la remediación de sitios contaminados por dicho compuesto, ya sea debido a operaciones de fabricación, actividades militares, quema abierta/detonación abierta, es requerida. Desafortunadamente, TNT es notoriamente recalcitrante para completar la biodegradación, es por ello que estudiar microorganismos que presenten esta capacidad es de gran importancia. La presente investigación plantea evaluar levaduras, aisladas de ambientes mineros, con posible uso potencial en la degradación del TNT. Para ello, un total de 29 cepas de levaduras fueron seleccionadas para la evaluación de tolerancia frente a TNT; de las cuales 5 cepas no manifestaron cambios en el crecimiento celular en concentraciones altas de TNT de hasta en 1500 mg/L, más si un cambio en el patrón morfológico (levadura-hifa-pseudohifa). Luego, las levaduras seleccionadas fueron caracterizadas molecularmente, mediante la amplificación y secuenciación de la región D1/D2 del gen LSU 28S rDNA. A partir del análisis bioinformático y filogenético confirmamos la identidad de las cepas 8TS-500Z, MD3-S1, MD10-A1 y MD10-A3 como *Candida orthopsilosis*, *Candida maltosa*, *Candida maltosa* y *Debaryomyces hansenii*, respectivamente. Posteriormente, se realizó la evaluación de cada cepa de levadura en la degradación de TNT, como única fuente de nitrógeno, monitoreando la degradación de TNT, el crecimiento celular y la liberación de nitrito. Las cepas *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 y *Candida maltosa* MD3-S1 lograron valores superiores en el porcentaje de remoción, 71.1 ± 0.5 % y 67.7 ± 2.6 %, respectivamente. Mientras que, las cepas *Candida maltosa* MD10-A1, *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1 y *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z presentaron porcentajes de 57 ± 4.1 %, 52.6 ± 1.2 % y 47.4 ± 3.1 %, a correspondencia, durante 84 h de incubación. El análisis de las constantes de velocidad de reacción (k) mediante modelos cinéticos de primer y segundo orden, la tasa específica de crecimiento (μ) y concentración de nitrito liberado durante la remoción de TNT a las 84 h de incubación, identificaron a la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 como la mejor en eliminación máxima de TNT; debido a una mayor constante de velocidad de reacción $k_I = 0.0159 \pm 0.0012 \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.9735$) y crecimiento $\mu = 0.0136 \pm 0.0025 \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.8724$);

además de presentar la concentración más alta de nitrito de 2.5 ± 0.18 mg/L a las 84 h de incubación.

Después, se utilizó un diseño factorial fraccionado 2^{5-1} , para evaluar qué factores influyen en la eficiencia de degradación de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3. Los factores seleccionados fueron: glucosa (2.52 - 7.56 g/L), NH_4Cl (0 - 0.2 g/L), tween 80 (0.1 - 0.5 %), inóculo inicial (0.3 - 0.7 DO) y pH (4.5 - 7.5). Los análisis ANOVA mostraron como los factores más influyentes, en el porcentaje de remoción de TNT, a glucosa, NH_4Cl y pH con *valores-P* < 0.05. Además, se encontró que el efecto de estos factores en la remoción de TNT puede expresarse adecuadamente mediante un modelo polinómico de primer orden ($r^2 = 0.998$). Finalmente, se validó el modelo determinado en condiciones óptimas, logrando un incremento en la eficiencia de remoción de hasta un 140 % a las 24 horas; además de incrementar su constante de velocidad de remoción en un 132.5 % ($k_1 = 0.0379$). Todos los análisis realizados indican la capacidad de nuestras cepas de levaduras, aisladas de ambientes mineros, en la remoción efectiva de TNT. Las cuales representan un potencial en la remediación de ambientes contaminados no sólo con TNT, sino probablemente de un amplio rango de compuestos nitroaromáticos presentes en productos farmacéuticos, agrícolas e industriales que contaminan persistentemente el ambiente.

PALABRAS CLAVE: 2,4,6-trinitrotolueno, tóxico, levadura, biodegradación, densidad celular, nitrito, diseño factorial fraccionado.

ABSTRACT

2,4,6-trinitrotoluene (TNT) is a nitroaromatic explosive that, when released into the environment, generates toxic and mutagenic risks. Therefore, remediation of sites contaminated by said compound, whether due to manufacturing operations, military activities, open burning / open detonation, is required. Unfortunately, TNT is notoriously recalcitrant to complete biodegradation, that is why to study microorganism that exhibit this capacity is of great importance. The present investigation proposes to evaluate yeasts isolated from mining environments, with possible potential use in degradation over TNT. For this, a total of 29 yeast strains were selected for the evaluation of the tolerance against TNT; of which 5 strains showed no changes in cell growth in high TNT levels of up to 1500 mg/L; more if, changes in the morphological pattern (yeast-hyphae-pseudohyphae). Then, the yeasts selected, were molecularly characterized, by amplifying and sequencing of the D1/D2 region of the LSU 28S rDNA gene. From the bioinformatic and phylogenetic analysis we confirmed the identity of strains 8TS-500Z, MD3-S1, MD10-A1 and MD10-A3 as *Candida orthopsilosis*, *Candida maltose*, *Candida maltose* and *Debaryomyces hansenii*, respectively. Subsequently, we evaluated the capacity of each yeast strain for TNT remover, monitoring the degradation of TNT, cell growth and the release of nitrite. Strains *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 and *Candida maltose* MD3-S1 achieved a high percentage of removal with $71.1 \pm 0.5 \%$ and $67.7 \pm 2.6 \%$, respectively. While, the lowest percentages were obtained with strains *Candida maltose* MD10-A1, *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1 and *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z with $57. \pm 4.1\%$, $52.6 \pm 1.2\%$ and $47.4 \pm 3.1\%$, correspondence, during 84 h of incubation. The analysis of the reaction rate coefficients (k), in first and second-order kinetic models, the specific growth rate (μ) and nitrite concentration released during the removal of TNT at 84 hours of incubation, identified the strain *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 as the best in the maximum elimination of TNT; due to a higher reaction reaction coefficient $k_I = 0.0159 \pm 0.0012 \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.9735$) and growth $\mu = 0.0136 \pm 0.0025 \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.8724$); in addition, it gets the highest nitrite concentration of $2.5 \pm 0.18 \text{ mg/L}$ at 84 h of incubation.

Then, a fractional factorial design 2^{5-1} was used to evaluate which of the factors influence the degradation efficiency of TNT by strain *Debaryomyces hansenii* MD10-A3. The factors selectionated were glucose (2.52 - 7.56 g/L), NH_4Cl (0 - 0.2 g/L), tween 80 (0.1 - 0.5 %), initial inoculum (0.3 - 0.7 DO) and pH (4.5 - 7.5). The ANOVA analyzes shown as the most influential factors, in the percentage of elimination of TNT, glucose, NH_4Cl and pH with *P-value* <0.05. In addition, it was found that the effect of these factors, in the removal of TNT, can be correctly expressed by a first-order polynomial model ($r^2 = 0.998$). Finally, the model was validated under optimal conditions, achieving an increase in removal efficiency of up to 140 % at 24 hours; in addition to increasing its reaction rate coefficients by 132.5 % ($k_1 = 0.0379$). All the analyzes carried out indicate the capacity of our yeasts strains, isolated from mining environments, in the effective removal of TNT; which represent a great potential in the remediation of contaminated environments, probably not only with TNT, but with others of nitroaromatic compounds present in pharmaceutical, agricultural and industrial products that persistently pollute the environment.

KEY WORDS: 2,4,6-trinitrotoluene, toxic, yeast, biodegradation, cell density, nitrite, fractional factorial design.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los compuestos nitroaromáticos son contaminantes ambientales que se utilizan en muchos procesos industriales, incluida la producción de pesticidas, colorantes, polímeros, plásticos, herbicidas, explosivos, textiles, papel y productos farmacéuticos (Mercimek et al., 2015). El TNT es el nitroaromático más recalcitrante, principalmente debido a la ubicación simétrica de los grupos nitro en el anillo aromático, lo cual limita el ataque de enzimas que participan en el metabolismo microbiano de los compuestos aromáticos (Mulla et al., 2014; Wittich et al., 2008).

El TNT es un contaminante altamente tóxico, un contacto ocasional puede causar lesiones leves y su contacto prolongado lesiones crónicas, anemia aplásica, crisis hemolítica, toxicidad reproductiva, ictericia tóxica y hasta la muerte. (Sheibani et al., 2011a; Yang et al., 2018). A pesar de que el TNT ha sido ampliamente reportado como tóxico, mutagénico y carcinogénico (grupo C) (Castellanos et al., 2016; Mercimek *et al.*, 2015; Sheibani et al., 2011b; Yang *et al.*, 2018) y que sus concentraciones se encuentren reglamentadas, en suelo de 17.2 mg/L y en agua a 2 µ/L (Chatterjee *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018); el TNT es el compuesto nitroaromático más utilizado (Khan et al., 2013), debido a que éste compuesto posee una serie de características que lo hacen irremplazable (Juhasz & Naidu, 2007; Van et al., 2015).

Numerosos estudios han reportado el uso de tratamientos fisicoquímicos para tratar ambientes contaminados con TNT, entre los que destacan la incineración de suelos, el compostaje y el almacenamiento en depósitos; los cuales generan problemas como la emisión de gases tóxicos, destrucción de los suelos e infiltración a las aguas subterráneas (Mercimek *et al.*, 2015; Ziganshin et al., 2010b). Otros tratamientos como la reducción electroquímica y oxidación hidrotérmica de nitroaromáticos pueden ser competitivos, pero se desarrollan bajo altos costos de materiales, instalaciones y operativos, así como el uso intensivo de energía (Kalderis et al., 2011).

Sin embargo, la biodegradación es, sin duda, uno de los medios más atractivos, debido a la ventaja costo-efectiva y ecológica (Avila-Arias et al., 2017; Yang et al., 2018; Ziganshin et al., 2010b). El uso de microorganismos ha sido uno de los métodos que contribuye en procesos naturales de degradación por su versatilidad metabólica y su capacidad de adaptarse con gran rapidez a condiciones de estrés químico. Se han reportado microorganismos capaces de degradar TNT, entre ellos tenemos a bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Mercimek et al., 2015; Wittich et al., 2008), *Pseudomonas putida* (Khan et al., 2013), *Achromobacter spanius* y *Pseudomonas veronii* (Avila-Arias et al., 2017), *Bacillus cereus* (Mercimek et al., 2013) entre otras, hongos como *Aspergillus sp.* (Castellanos et al., 2016) y sólo cinco géneros de levaduras reportadas como *Yarrowia lipolytica* (Jain et al., 2004; Khilyas et al., 2017; Pannier, 2009; Ziganshin et al., 2010b), *Candida sp.* (Ziganshin et al., 2007b), *Geotrichum candidum* (Ziganshin et al., 2010a) y *Saccharomyces sp.* (Zaripov et al., 2002)

La degradación aeróbica de TNT por microorganismos se da principalmente por dos vías metabólicas, por reducción del grupo nitro y reducción del anillo aromático. La reducción del grupo nitro del TNT, genera productos como nitroso e hidroxilamino-dinitrotoluenos (HADNT), que resultan aún ser altamente tóxicos (Ziganshin & Gerlach, 2014); y la reducción directa del anillo aromático del TNT (hidruro-TNT o la formación del complejo de Meisenheimer) que da como resultado la desnitración del TNT y la destrucción del sistema aromático con liberación de nitrógeno en forma de NO_2^- (Liang et al., 2017; Ziganshin & Gerlach, 2014; Ziganshin et al., 2007b; Ziganshin et al., 2010b). Además, se ha reportado la capacidad de algunos microorganismos de llevar a cabo la degradación de TNT por ambas vías metabólicas, siendo la ruta principal la reducción de anillo aromático (Khilyas et al., 2017; Smets et al., 2007; Wittich et al., 2008; Ziganshin & Gerlach, 2014; Ziganshin et al., 2007b).

Por todo ello, evaluar células de levaduras con capacidades de degradación, nos permitiría un amplio rango de selección de microorganismos que podrían transformar productos químicos tóxicos a inocuos; y por lo tanto, recuperar el ambiente contaminado.

HIPÓTESIS

Existen levaduras en ambientes mineros con capacidad de tolerar compuestos nitroaromáticos como el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) y utilizarlos en su metabolismo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Seleccionar levaduras con potencial de remediación de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) y evaluar su capacidad de degradación.

Objetivos específicos

1. Determinar la tolerancia al TNT en levaduras nativas, mediante la evaluación del efecto sobre el crecimiento y morfología celular.
2. Identificar molecularmente las levaduras con mayor tolerancia sobre al 2,4,6-trinitrotolueno (TNT).
3. Evaluar la capacidad de remoción de TNT por las cepas de levaduras con mayor tolerancia al TNT.
4. Evaluar el efecto de la glucosa, tamaño de inóculo, tween 80, NH_4Cl y pH en la cepa de levadura con mayor metabolismo sobre el TNT.

VARIABLES

En la Tabla 1 se muestra las variables e indicadores que se evaluaron en la presente investigación:

Tabla 1. Descripción de variables independientes y dependientes.

Variables independientes	Indicadores	Categorías/Unidad	Tipo de variable/ escala
Concentración de TNT (C_{TNT}).	C_{TNT} inicial.	- Control - 200-500-1000 y 1500 mg L ⁻¹ - 200 mg L ⁻¹	Cuantitativa Continua/ Razón
Especie biológica.	Levaduras aisladas de ambientes mineros	29 cepas de levaduras	Cualitativa/ Nominal
Variables dependientes	Indicadores	Categorías/Unidad	Tipo de variable/ escala
Crecimiento celular de levaduras degradadoras de TNT	Crecimiento celular de levaduras Tasa de crecimiento específico μ	UFC/mL y D.O h ⁻¹	Cuantitativa Discreta/ Razón
Concentración de NO ₂ ⁻	Concentración NO ₂ ⁻	mg/L	Cuantitativa Continua/ Razón
Concentración final de TNT (C_{TNT})	C_{TNT} residual	mg/L	Cuantitativa Continua/ Razón
Porcentaje de remoción de TNT. (% R_{TNT})	Concentración de TNT removido expresada en porcentaje.	% R_{TNT}	Cuantitativa Continua
Parámetros cinéticos de remoción de TNT	Coefficiente de velocidad de reacción (k_1 y k_2)	h ⁻¹ mg.L ⁻¹ .h ⁻¹	Cuantitativa Discreta/ Razón

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)

El 2,4,6-trinitrotolueno es un compuesto aromático, observado como cristales transparentes o amarillos. La producción de TNT se realiza mediante nitración secuencial de tolueno con una mezcla de ácido nítrico y sulfúrico (Juhasz & Naidu, 2007; Pannier, 2009). Algunos otros nombres usados para el TNT son: 1-metil-2,4,6-trinitrobenceno, metiltrinitrobenceno, tolit, trilit, y otros. Su estructura química la podemos observar en la Figura 1, presentando una composición química de $C_6H_2(NO_2)_3CH_3$.

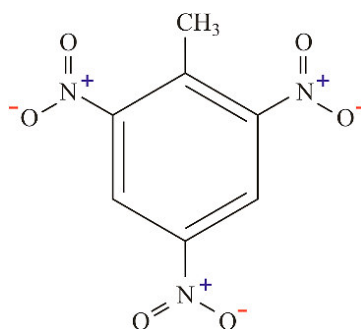


Figura 1. Estructura química de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT).

El TNT es un compuesto nitroaromático simétrico, con grupos nitro presentes en un anillo de carbono en las posiciones 2, 4 y 6, y un grupo metilo presente en la posición 1. Esta configuración molecular lo hace altamente recalcitrante. Pues, existe una protección de los π -electrones del anillo aromático contra los mecanismos oxidativos y electrofílicos (Pannier, 2009). Más específicamente, la carga positiva parcial presente en el átomo de nitrógeno le da la capacidad de extraer los electrones presentes en el anillo aromático, generando una molécula altamente deficiente en electrones; y por lo tanto impidiendo su degradación mediante oxidación (Mulla *et al.*, 2014; Stenuit & Agathos, 2010; Yang *et al.*, 2018). Por lo tanto, su destino ambiental depende de las interacciones específicas de sorción donante-aceptor de

electrones y de las transformaciones reductoras (bio) nucleófilas (Juhasz & Naidu, 2007; Stenuit & Agathos, 2010).

El TNT es química y térmicamente estable, tiene bajo punto de fusión, baja sensibilidad al impacto y fricción, lo cual es favorable para su producción (Juhasz & Naidu, 2007; Van *et al.*, 2015). Este nitroaromático es escasamente soluble en agua y tiene una baja presión de vapor y baja volatilidad. Además, presenta un valor de coeficiente de partición octanol-agua ($K_{ow} = 1.86$), lo cual indica que, una vez disuelto, el TNT no se absorberá fuertemente al suelo/sedimento y, por lo tanto, puede ser móvil en el ambiente (Juhasz & Naidu, 2007; Stenuit & Agathos, 2010), afectando nuestro ecosistema.

2.2. Contaminación ambiental por 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)

Los explosivos son sustancias energéticas que contaminan el ambiente durante su liberación; lo cual representa un gran riesgo tóxico en nuestro ecosistema (Smets *et al.*, 2007). La liberación o exposición a los explosivos ocurre a través de operaciones de fabricación, actividades militares, conflictos de diferentes niveles, quema abierta, detonación abierta, descarga de municiones, entre otras (Chatterjee *et al.*, 2017). Entre los diferentes componentes de explosivos, el 2,4,6-trinitrotolueno es el más común (Khilyas *et al.*, 2017), debido al valor de su potencia como unidad, y este valor lo califica como un explosivo intermedio respecto a la nueva generación de explosivos y/o mezclas de ellos (Juhasz & Naidu, 2007).

La contaminación del ambiente se da debido a la existencia de la interacción entre la molécula de TNT y la interfaz de reacción específica con la materia orgánica del suelo, mediante combinación oxidativa. Dicha interacción permitiría la potencial contaminación de los cuerpos de agua mediante la percolación del tóxico y sus derivados a través de la red de distribución natural (Chatterjee *et al.*, 2017), afectando el ambiente, incluidas la vida marina y costera (Figura 2).

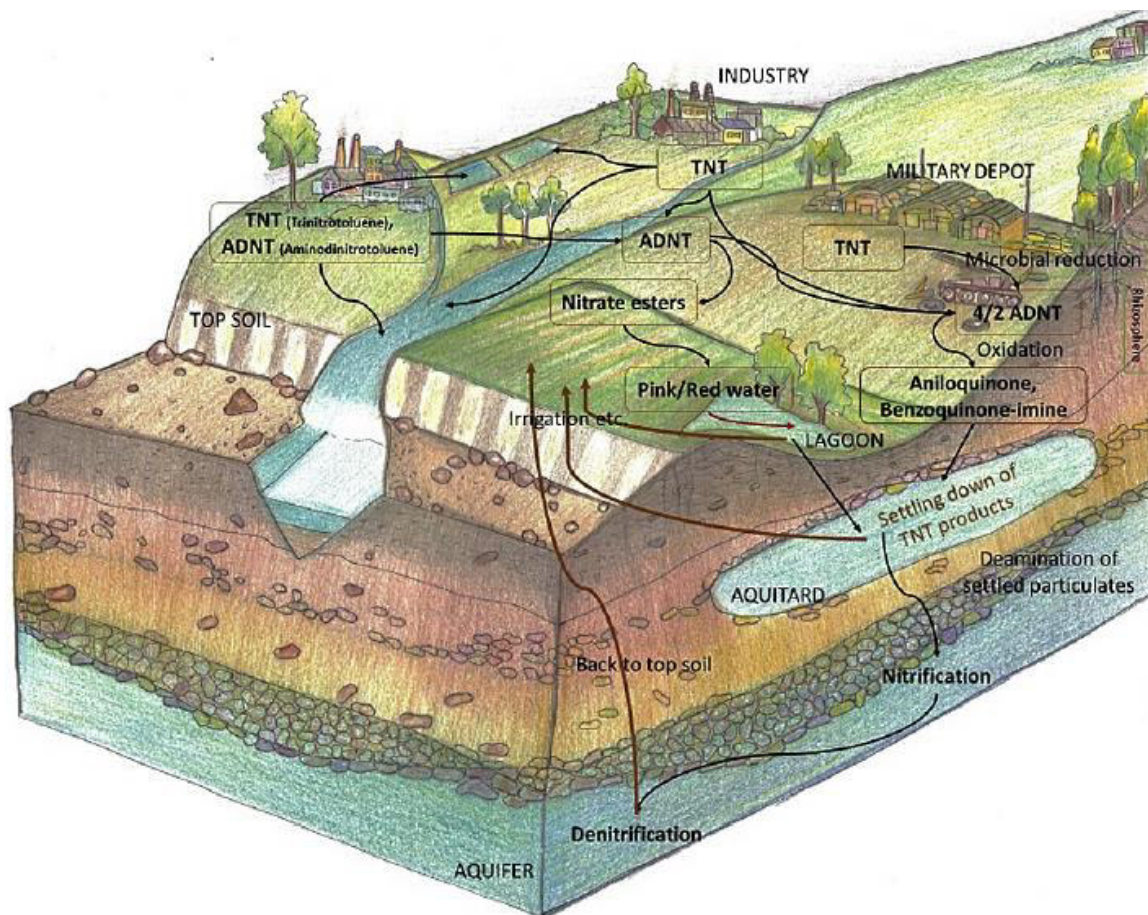


Figura 2. Destino ambiental de explosivo TNT y su circulación a través de campos agrícolas y cuerpos de agua (Chatterjee *et al.*, 2017).

La Agencia de Protección Ambiental de USA (USEPA) ha recomendado límites de la exposición de TNT en agua y suelo. La regulación menciona un límite de 2 $\mu\text{g/L}$ en agua y en suelo su contenido se debe limitar a 17.2 mg/L (Chatterjee *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Sin embargo, las concentraciones de TNT presentes en el suelo pueden variar desde niveles de traza de hasta 14 000 mg/kg de suelo, nivel que se encuentra cerca de su nivel explosivo (Sheibani *et al.*, 2011b).

La fabricación de TNT genera quinientos mil galones de agua contaminados con TNT y otros compuestos nitroaromáticos anualmente, los cuales son liberados al ambiente, logrando algunas veces llegar a concentraciones de contaminación tan elevada como 200 g de TNT por 1kg de suelo (Mulla *et al.*, 2014). Su distribución heterogénea en el suelo restringe la movilidad, la degradación microbiana y también su análisis, afectando a los organismos en los diferentes niveles tróficos de nuestro ecosistema.

2.3. Toxicidad de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)

El TNT y sus metabolitos son altamente tóxicos para diversos organismos, incluidos mamíferos, peces, insectos y bacterias (Claus, 2014; Khan *et al.*, 2013; Mulla *et al.*, 2014; Smets *et al.*, 2007). Los factores de riesgo para la salud humana de la exposición a TNT afectan principalmente a los trabajadores de las fábricas de municiones y los sitios de eliminación y se clasifican como carcinógenos del grupo C (Castellanos *et al.*, 2016; Mercimek *et al.*, 2015; Mulla *et al.*, 2014; Sheibani *et al.*, 2011b; Yang *et al.*, 2018)

El TNT y sus metabolitos pueden ingresar al sistema humano por vía oral y por inhalación y absorción de la piel. Después de su exposición, estos compuestos persisten en el cuerpo, habiendo sido encontrado el TNT en el tracto gastrointestinal, la piel, el hígado, los riñones y los pulmones; y sus metabolitos han sido identificados en la orina de los trabajadores, lo que indica que TNT y sus metabolitos se excretan lentamente del cuerpo (Mulla *et al.*, 2014). Sus efectos tóxicos en los humanos resultan en trastornos, como anemia, hemólisis, deterioro del sistema nervioso, cataratas y toxicidad hepática (Mulla *et al.*, 2014; Sheibani *et al.*, 2011a; Yang *et al.*, 2018); además de sus probables efectos mutagénicos y/o carcinogénicos (Chatterjee *et al.*, 2017).

Los síntomas de intoxicación en humanos después de la inhalación o absorción dérmica de mononitrotolueno, dinitrotolueno y TNT se observan días después de la exposición; manifestando dolor de cabeza, pérdida de apetito, mareos, náuseas, insomnio, entumecimiento de diversas partes de la piel y diarrea. La cianosis es un síntoma que llama mucho la atención, debido a la coloración rojo azulada de los labios, uñas y piel. Este síntoma es causado por la deficiencia de oxígeno en la sangre, debido a la formación de metamoglobina y hemólisis por metabolitos del TNT (Claus, 2014).

Para microorganismos, tales como levaduras, actinomicetos y bacterias Gram-positivas, el TNT es tóxico a concentraciones de aproximadamente 50 mg/L. Además, los metabolitos de su degradación se clasifican como muy tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos (Claus, 2014; Chatterjee *et al.*, 2017; Ziganshin & Gerlach, 2014). Las

investigaciones reportan que los efluentes generados por la producción de TNT, son extremadamente tóxicos, por ejemplo en los siguientes organismos: *Daphnia similis*, *Danio rerio*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* y *Pseudokircheneriella subcaptata* (Claus, 2014; Chatterjee *et al.*, 2017).

2.4. Bioremediación de TNT

Los compuestos xenobióticos nitroaromáticos, entre ellos el TNT, causan un grave daño al ambiente; por lo cual, la búsqueda de nuevas alternativas costo-efectivas de remoción o transformación son de gran importancia. El uso de organismos vivos, para eliminar o neutralizar este tipo de contaminante, ha sido ampliamente reportado (Chatterjee *et al.*, 2017). Por ejemplo, existen estudios de remediación de TNT, llevados a cabo por plantas y microorganismos como: hongos, levaduras y bacterias, en los cuales se evalúa los procesos metabólicos y de mineralización para contrarrestar su posible toxicidad.

La flexibilidad metabólica, diversidad y fácil manejo hacen de los microorganismos una herramienta importante y prometedora (Avila-Arias *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Ziganshin *et al.*, 2010b). Sin embargo, a pesar de un gran número de estudios sobre la degradación del TNT, aún es impreciso el conocimiento de las rutas metabólicas de degradación del TNT. Las vías de transformación microbiana de TNT propuestas hasta el momento se dan en condiciones anaeróbicas y aeróbicas (Khan *et al.*, 2013). Una de las vías de transformación poco reportadas es la vía oxidativa, la cual curre en el grupo metilo. Durante la oxidación del grupo metilo, los productos típicos son alcoholes, aldehídos, y derivados de ácidos carboxílicos (Pannier, 2009).

Las principales vías metabólicas conocidas, por las que algunos microorganismos degradan el TNT, son tres (Khan *et al.*, 2013). Una se da en condiciones de anaerobiosis y consiste en una transformación secuencial de los grupos nitro unidos al anillo aromático hacia la correspondiente amina; esta vía de transformación es generalmente realizada por microorganismos anaeróbicos, donde *Clostridium sp.* es uno de los más reportados, junto

con algunas bacterias sulfatoreductoras como *Desulfovibrio sp.* (Gallagher, 2010; Mulla *et al.*, 2014).

Las dos vías metabólicas restantes se dan en condiciones aeróbicas, una denominada vía de reducción del grupo nitro, la cual parece ser la más comúnmente observada en la transformación de TNT por microorganismos (Ziganshin & Gerlach, 2014). La reducción del grupo nitro conduce a la formación de triaminotolueno (TAT), pero esto se observa raramente, los productos de metabolitos usuales son amino-dinitrotoluenos (ADNTs) y diamino-nitrotoluenos (DANTs), que se forman a través de la transformación de hidroxilamino-dinitrotoluenos (HADNTs) (Pannier, 2009; Ziganshin & Gerlach, 2014). La otra vía en condiciones aeróbicas es llamada vía por reducción del anillo aromático, se traduce en la aparición de complejos hidruro-Meisenheimer (H^- -TNT), dihidruro-Meisenheimer ($2H^-$ -TNT), dihidruro-Meisenheimer protonados ($2H^-$ -TNT $\cdot H^+$), que finalmente conducen a la eliminación de grupos nitro de los sistemas aromáticos, en forma de nitrito, así como la posible destrucción del esqueleto aromático del TNT hasta su mineralización (Liang *et al.*, 2017; Mercimek *et al.*, 2015; Ziganshin & Gerlach, 2014).

2.5. Vías de biodegradación en condiciones aeróbicas

2.5.1. Reducción del grupo nitro del TNT

La reducción de los grupos nitro en el TNT no muestran el mismo comportamiento. La posición *para* del TNT se reduce, probablemente, por el efecto despantallante del metilo sobre el grupo nitro en *orto*. Biológicamente la reducción del grupo nitro es regioselectiva para la trayectoria de reducción del TNT en posición *para* (Borch *et al.*, 2005). La reducción produce hidroxilamino-dinitrotoluenos (HADNT), el cual es un intermediario metaestable y fácilmente detectable en el camino para completar la reducción del grupo nitro al grupo amino (Ziganshin & Gerlach, 2014).

Uno de los hongos más ampliamente estudiados *Phanerochaete chrysosporium*, quien demostró eficiencia en la transformación de TNT en varios productos primarios (HADNT y ADNT) y secundarios (azoxy y azo), pero no fue capaz de mineralizar completamente TNT a TAT, utilizando la vía de nitro reducción (Kalderis *et al.*, 2011; Mulla *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2005).

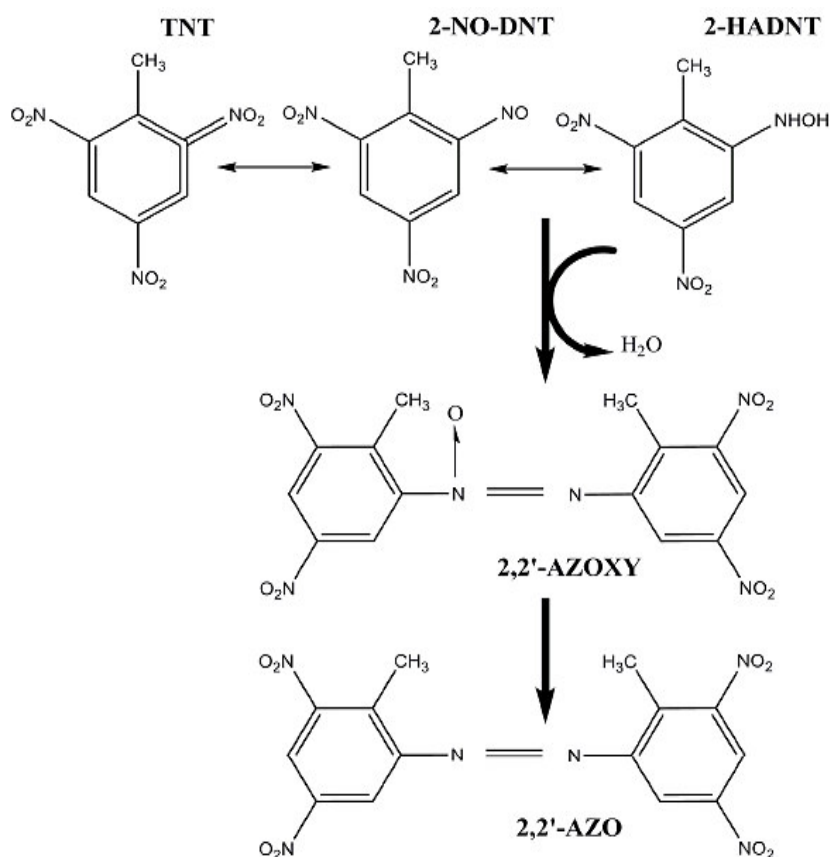


Figura 4. Reacción de condensación de los compuestos nitrosodinitrotoluenos (NO-DNT) y hidroxilaminodinitrotoluenos HADNT (Pannier, 2009).

2.5.2. Reducción del anillo aromático del TNT

La transformación del TNT mediante la vía de reducción del anillo aromático, al ser una de las vías más complejas, es también la menos conocida, aunque no se han determinado con seguridad todos los metabolitos producidos, se cree que la etapa final de esta ruta es la mineralización total del TNT (Mercimek *et al.*, 2015; Wittich *et al.*, 2008; Ziganshin & Gerlach, 2014).

La deficiencia electrónica del anillo aromático del TNT hace posible el ataque nucleofílico al anillo que daría lugar a estructuras no aromáticas del tipo de los complejos Meisenheimer. Estos compuestos presentan una intensa coloración roja-anaranjada en solución, y una carga negativa deslocalizada sobre el anillo y los grupos nitro. El producto de la transformación de TNT es con frecuencia 3-H⁻-TNT (monohidruro-Meisenheimer), formado por sustitución nucleofílica de un átomo de carbono aromático por un ion hidruro. Además, se forman hidruro, dihidruro y complejo dihidruro-Meisenheimer protonado (Khilyas *et al.*, 2017; Pannier, 2009; Yang *et al.*, 2018; Ziganshin & Gerlach, 2014; Ziganshin *et al.*, 2010b). Muchos estudios mencionan la especial presencia de iones nitrito en los medios de cultivo como un producto de reducción del anillo aromático (Liang *et al.*, 2017; Smets *et al.*, 2007; Ziganshin *et al.*, 2007b; Ziganshin *et al.*, 2010b); demostrando el empleo fundamental de éste nitrógeno inorgánico liberado en la integración como nitrógeno orgánico en las células (Serrano-González *et al.*, 2018). Es por ello que, es considerada la vía menos tóxica y con gran potencial posible de mineralización de TNT (Mercimek *et al.*, 2015; Wittich *et al.*, 2008; Ziganshin & Gerlach, 2014).

Sin embargo, la liberación de nitrito no es exclusivo de ésta vía, ya que puede darse a través de reacciones reacciones (incluidas las reacciones abióticas) entre los compuestos HADNT y complejos de dihidruro de Meisenheimer con producción de amino-dimetil-tetranitrobifenilos o diarilaminas secundarias (Wittich *et al.*, 2008; Ziganshin & Gerlach, 2014).

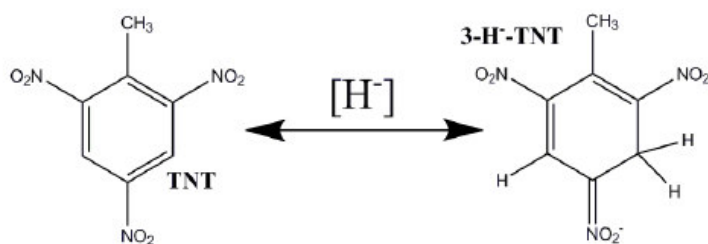


Figura 5. Formación del complejo C-3-H⁻-TNT a partir de TNT (Claus, 2014).

La reducción de anillo aromático de TNT, por lo general se produce en la posición C3 en el anillo aromático, lo que resulta en monohidruro 3-H-TNT (Ziganshin *et al.*, 2007a), la cual se puede observar en la Figura 5.

Algunos estudios han analizado las enzimas que intervienen en este proceso de transformación, en particular la familia de enzimas conocidas como OYE (*old yellow enzymes*) (Khilyas *et al.*, 2017; Wittich *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2018); además, indican que las enzimas pentaeritriol tetranitrato reductasa (PETN reductasa), xenobiotic reductasa B (XenB) y N-etilmaleimida reductasa (NemA), son capaces de reducir TNT vía complejo hidruro-Meisenheimer (H⁻-TNT), complejo dihidruro-Meisenheimer (2H⁻-TNT), y complejo dihidruro-Meisenheimer protonado (2H⁻-TNT-H⁺) (Mulla *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2005; Smets *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2018).

Actualmente, no se reportan muchos microorganismos capaces de llevar a cabo este mecanismo; sin embargo, se conoce con certeza que *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae* y *Rhodococcus erythropolis* son capaces de degradar compuestos nitroaromáticos mediante esta vía. Se encontró a *Enterobacter cloacae* PB2 capaz de utilizar TNT como única fuente de nitrógeno, pero con lento crecimiento en el medio. El complejo hidruro-Meisenheimer fue también evidenciado en un estudio usando *Mycobacterium sp.* y en la degradación 2,4,6-trinitrofenol por *Rhodococcus erythropolis*. En este último estudio se observó que los medios con ácido pícrico tornaron a rojo-naranja tras la formación del complejo de hidruro-Meisenheimer. Además, de un número limitado de levaduras pertenecientes a cinco géneros. Las levaduras reportadas son *Yarrowia lipolytica* (Jain *et al.*, 2004; Khilyas *et al.*, 2017; Pannier, 2009; Ziganshin *et al.*, 2010b), *Candida sp.* (Ziganshin *et al.*, 2007b), *Geotrichum candidum* (Ziganshin *et al.*, 2010a) y *Saccharomyces sp.* (Zaripov *et al.*, 2002).

Otra característica que ha sido identificada en los microorganismos es la capacidad de degradar TNT por ambas vías (Figura 6), tanto por la vía de reducción de anillo aromático y la de reducción de grupo nitro (Khilyas *et al.*, 2017; Ziganshin & Gerlach, 2014; Ziganshin *et al.*, 2010a; Ziganshin *et al.*, 2010b). Sin embargo, algunos autores demuestran que la vía principal sería la vía de reducción del anillo aromático (Khilyas *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018), pues ésta vía presenta una menor energía de activación a superar requerida a los microorganismos (6.7 kcal.mol⁻¹), a diferencia de la vía reducción del grupo nitro (26.6 kcal.mol⁻¹) (Yang *et al.*, 2018).

Ziganshin *et al.* (2007a), reportaron la capacidad de *Y. lipolytica* AN-L15 para reducir TNT, principalmente por la vía de la reducción del anillo aromático, y en segundo lugar, a través de la vía de la reducción de grupo nitro. Los autores informaron la formación de HADNTs, ADNTs, ocho complejos de hidruro y nitritos como productos reductores de TNT.

Vía secundaria de transformación de TNT

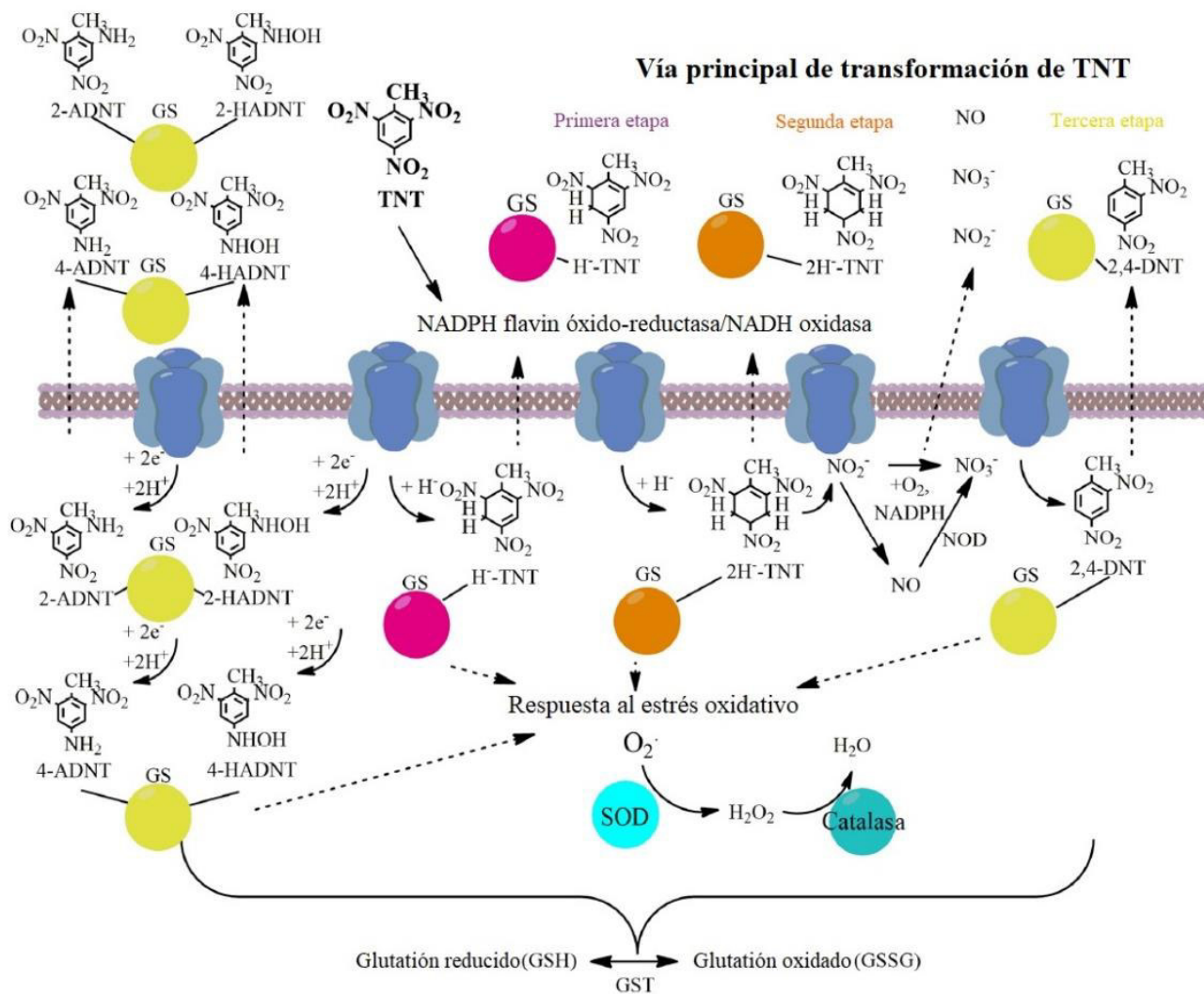


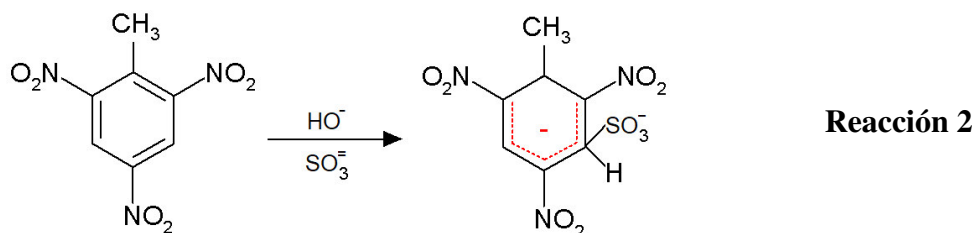
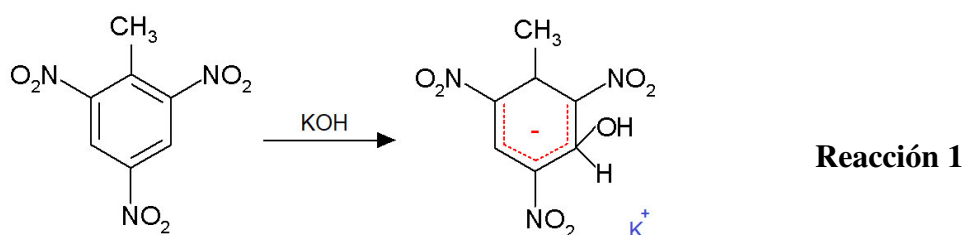
Figura 6. Esquema que ilustra las principales vías y las enzimas clave reguladas en la transformación de TNT por *Yarrowia lipolytica* (Khilyas et al., 2017).

2.6. Determinación de trinitrotolueno por método espectrofotométrico

El método espectrofotométrico está basado en la reacción de compuestos poliaromáticos y un álcali, como el hidróxido de potasio (KOH), pues producen

compuestos coloreados, los cuales son conocidos como aniones Jackson-Meisenheimer (Felt et al., 2002).

La formación clásica de aniones Jackson-Meisenheimer por adición de una base a la posición 3 del anillo del TNT se puede observar en la Reacción 1, la cual se produce rápidamente; sin embargo, inestable termodinámicamente. La adición de iones sulfito al anillo aromático generaría un anión aparentemente más estable que el formado sólo con hidróxido, Reacción 2.



Después de la adición de KOH y sulfito de sodio a muestras de TNT se obtuvo la absorbividad molar máxima de $4.3 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. La adición de acetona para la disolución de TNT revela absorbividades molares más grandes, por un factor de cuatro, que las producidas al disolver el TNT en metanol. Por lo tanto, éste aumento en la sensibilidad determinó el uso de acetona en el método propuesto por Jenkins (1990).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material químico

El TNT (pureza 99 %) se disolvió en acetona (60 mg TNT en 3 mL de acetona (C_3H_6O)) para una concentración de 20 g/L). El solvente se dejó evaporar para evitar interferencias en los ensayos.

3.1.2. Material biológico

Las cepas de levaduras seleccionadas fueron 29 (Tabla 12), las cuales fueron aisladas de ambientes mineros de tres regiones del Perú: Tumbes, Junín y Madre de Dios, otorgadas por el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

3.2. Metodología

3.2.1. Reactivación de material biológico

Las cepas de levaduras fueron cultivadas aeróbicamente en medio de cultivo YPG (Yeast Peptone Glucose), el cual contiene (g/L): glucosa, 20; peptona, 10; extracto de levadura, 5; a pH 6.5. El cultivo se mantuvo en agitación (120 rpm) a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 5 días.

3.2.2. Evaluación de tolerancia de cepas de levaduras al TNT

El proceso de tolerancia al tóxico, por las cepas de levaduras, se realizó mediante el incremento de concentraciones de TNT. La evaluación en un rango de valores fue para observar si las cepas de levaduras toleran la exposición de TNT sin manifestar ningún daño en el crecimiento y morfología celular.

Previamente, las levaduras pasaron por un proceso de adaptación, sometiéndolas a niveles bajos de concentración de TNT (50 mg/L) en medio sintético, con la siguiente composición (g/L): glucosa, 5.04; KH_2PO_4 , 1.09; Na_2HPO_4 , 1.14; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1; y MgSO_4 , 0.24 a pH 6.5 (Pannier, 2009; Ziganshin *et al.*, 2007a). El cultivo se mantuvo en agitación (120 rpm) a temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$) por 48 horas.

3.2.2.1. Efecto del TNT sobre el crecimiento celular de levaduras nativas

Las células de levaduras, luego del proceso de adaptación, fueron recolectadas, lavadas en 0.1 M de buffer fosfato de Sodio a pH 6.0; y transferidas a 20 mL de medio sintético, siendo la única fuente de nitrógeno el explosivo TNT, a pH 6.5 (Rahal & Moussa, 2011). El incremento de concentraciones de TNT fue de 200, 500, 1000, y 1500 mg/L. El cultivo se mantuvo en agitación (120 rpm) a temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$) por 3 días. El crecimiento celular fue determinado mediante lectura de la turbidez, de las suspensiones celulares, con un densitómetro DEN-1 BIOSAN. La concentración inicial de células se ajustó a 0.5 unidades de Macfarland equivalente a una densidad óptica de 0.125 a una concentración de 1.5×10^6 UFC/ml.

3.2.2.2. Efecto del TNT sobre la morfología celular de levaduras nativas

La evaluación morfológica, del efecto del TNT sobre las levaduras, se realizó mediante Microscopía óptica y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Las muestras fueron cultivadas en medio sintético, en presencia (100 mg/L) y ausencia de TNT, incubados a temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$) por 5 días.

El montaje, para la observación morfológica, se realizó sobre fragmentos de láminas cubreobjetos. Para ello, la siembra de células de levaduras se realizó por difusión en medio sólido. En seguida, los fragmentos de cubreobjetos fueron introducidos al

medio de cultivo en un ángulo de 45°. Al cumplir con el tiempo de incubación, las láminas cubreobjetos fueron retiradas y procesadas para el estudio morfológico.

El estudio morfológico mediante MEB pasó por procesos de fijación celular, 2.5 % glutaraldehído por 5 h.; lavado y deshidratación, en soluciones crecientes de etanol, 30, 50, 70 y 100 % por 10 min en cada paso. Por otro lado, el estudio morfológico mediante microscopía óptica se realizó con la técnica de tinción Gram.

3.2.3. Identificación Molecular

3.2.3.1. Extracción de DNA genómico

Las cepas de levaduras se cultivaron en medio líquido YPG a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 16-24 horas. El protocolo de extracción de ADN cromosómico fue realizado bajo la pauta del Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega®) (Anexo a). La ruptura de la pared celular fue realizada mediante el proceso *Freeze-thawing* (Dumont et al., 2006; Silva et al., 2012), con el uso de nitrógeno líquido. Para ello, se transfirió una alícuota de 1 mL de suspensión celular a un microtubo, el cual se incubó a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min; y a congelación en nitrógeno líquido por 5 min, se homogenizó en cada paso. Este proceso se realizó en 5 ciclos.

3.2.3.2. Amplificación del gen rRNA 28S

El ADN extraído fue usado para amplificación por PCR en la región D1/D2 LSU del gen 28S rRNA (Orbegozo et al., 2008). Se emplearon los iniciadores F63(5`-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3`) y LR3 (5`-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3`). El equipo empleado fue un termociclador MINICYCLER PTC -150 y el protocolo de PCR usado fue:

- Desnaturalización a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 min (1 ciclo); $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s (1 ciclo)
- Hibridación a $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s
- Elongación 2 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de 30 ciclos
- Elongación final 5 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ y incubación tiempo indefinido a 4°C

3.2.3.3. Electroforesis de ADN

Para visualizar el DNA genómico, se utilizaron una cámara de electroforesis Biometra[®] y geles de agarosa. Los geles se prepararon con agarosa al 1% en tampón TAE al 0.5%. Además, se utilizó una solución de azul de bromofenol (0.25%) y sacarosa (40%) como tampón de carga, la cual se mezcló con las muestras de ADN producto del PCR. El marcador de tamaño molecular usado fue de 1 Kb DNA *Ladder* (Promega[®]). La tinción del ADN se realizó al sumergir el gel en bromuro de etidio al 0.5%. Las bandas se observaron por fluorescencia emitida en un transiluminador Biometra[®] de luz UV (320 nm).

3.2.3.4. Secuenciación del gen rRNA 28S

La secuenciación fue llevada a cabo por la empresa MacroGen USA. Para ello, se prepararon muestras de 30-50 µL del amplificado por reacción y los iniciadores a una concentración de 20 pmol/µL (5 pmol/reacción).

Las secuencias obtenidas se compararon con las existentes en las bases de datos del GenBank/EMBL/DDJB, mediante el programa de alineamiento de secuencias BlastN versión 2.0 (Altschul et al., 1990). Luego, se realizó el alineamiento múltiple de secuencias con el programa Clustal X (Larkin et al., 2007).

3.2.3.5. Análisis filogenético

Por último, se construyó el árbol filogenético con el programa Mega 5.0 (Tamura et al., 2011), en el cual se calculó la distancia evolutiva mediante el modelo Kimura's dos-parámetros. Además, el árbol filogenético fue reconstruido por el método Neighbor-Joining con un modelo Compuesto de Máxima Verosimilitud evaluada por *bootstrapping* con 1000 réplicas.

3.2.4. Evaluación de la remoción de TNT por levaduras

3.2.4.1. Remoción de TNT por levaduras tolerantes

La incubación aeróbica se realizó en agitación en frascos (250 mL) con 100 mL de medio sintético, al cual se añadió 200 mg/L de TNT como única fuente de nitrógeno (Zaripov *et al.*, 2002) a pH 6.5. El cultivo se mantuvo en agitación (120 rpm) a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 84 horas. La concentración inicial de células se ajustó a una densidad óptica de 0.5 de DO, utilizando el medio sintético libre de células como referencia.

La toma de muestra se realizó en 8 puntos cada 12 horas, incluyendo el punto cero. Se determinó concentración de TNT, nitrito y el crecimiento celular en cada muestra. Se estableció un frasco control con medio sintético y stock de TNT. Además, los ensayos de remoción de TNT se realizaron por triplicado para cada una de las cepas seleccionadas.

3.2.4.2. Efecto de factores en la capacidad degradadora de TNT

Este procedimiento se llevó a cabo empleando la cepa con mayor porcentaje de remoción de TNT, empleando el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV. Se trabajó en un diseño experimental fraccionado del tipo 2^{n-p} , donde n es el número de factores y p el número de bloques.

Los factores a evaluar fueron el pH, el inóculo y las concentraciones co-sustratos, glucosa, NH_4Cl y tween 80, como agente tensoactivo. Los factores se trabajaron en tres niveles [1, 0, -1], que se representa en la Tabla 2, y presenta el valor real y el código de las variables en el nivel bajo, medio y alto.

Tabla 2. Matriz de factores y niveles con su codificación.

Símbolo	Factor	Nivel		
		-1	0	1
A	Glucosa (g/L)	2.52	5.04	7.56
B	NH ₄ Cl (g/L)	0	0.1	0.2
C	Tween 80 (%)	0.1	0.3	0.5
D	pH	4.5	6	7.5
E	Inóculo (DO)	0.3	0.5	0.7

Se obtuvieron un número de 16 ensayos, más 3 réplicas del punto central. La respuesta fue el porcentaje de remoción de TNT; además, se estimó la concentración de nitrito (NO₂⁻).

3.2.5. Procedimiento analítico

3.2.5.1. Análisis de crecimiento celular

Se tomó 1 mL del cultivo y se realizó diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻³ en solución salina al 0.85 % (p/v). Las diluciones fueron sembradas por el método de microgota tomando 20 µL y depositándolos en agar YPG, desde una altura no mayor de 2 cm, dividiendo la placa Petri en cuatro cuadrantes y sembrando en cada uno tres réplicas de las diluciones realizadas. El número de colonias obtenido fue multiplicado por el factor de corrección (50) para completar el recuento al mililitro y finalmente, por el factor de dilución empleado. El recuento es reportado en UFC/mL (Collins, 1989).

La ecuación usada como modelo de crecimiento de levaduras, durante la fase exponencial fue la siguiente (Gupthar et al., 2000):

$$\mu = \frac{1}{\bar{x}} \frac{dx}{dt}$$

Ecuación 1

Dónde x es la densidad celular (UFC/mL), t es el tiempo en horas (h) y μ es la tasa de crecimiento específico (h^{-1}). La integración de la ecuación 1

$$x = x_0 \exp[\mu (t - t_0)] \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde x_0 es la densidad celular (UFC/mL) en el $t = t_0$

Según Miriam (2016), el tiempo de duplicación (DT) requerido para que la población de microorganismos sea el doble, se calculó usando la siguiente fórmula:

$$DT = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Ecuación 3}$$

Así también, el número de las generaciones producidas por día (GD) se calculó como sigue:

$$GD = \frac{\mu}{\ln 2} \quad \text{Ecuación 4}$$

3.2.5.2. Determinación de TNT

La concentración de TNT fue analizada mediante un ensayo colorimétrico desarrollado por Jenkins (1990), utilizando el espectrofotómetro UNICO 2100UV, con celda de cuarzo de 1 cm. Brevemente, se realizó una mezcla de 1 mL de muestra, 1 mL de acetona y 0.5 mL de KOH (0.1 N). Seguidamente, se agregó 0.12 M de Na_2SO_3 anhidro, para estabilizar el producto de reacción. Por último, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura a 540 nm (Jenkins, 1990; Sheibani *et al.*, 2011a). El porcentaje de remoción de TNT (R_{TNT}) fue calculado, como se indica en la ecuación 5.

$$R_{TNT} = \frac{TNT_0 - TNT_t}{TNT_0} \times 100\% \quad \text{Ecuación 5}$$

Además, se establecieron dos modelos cinéticos para el proceso de degradación de TNT, en los cuales se calculó la constante de velocidad de reacción (k) y el coeficiente de correlación para cada una de las cepas de levaduras. Se utilizaron

modelos de primer (Ecuación 6) y segundo orden (Ecuación 7) (Avila-Arias *et al.*, 2017).

$$[TNT]_t = [TNT]_0 \exp(-k_1 t) \quad \text{Ecuación 6}$$

$$[TNT]_t = \frac{[TNT]_0}{1 + k_2 [TNT]_0 t} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde $[TNT]_0$ y $[TNT]_t$ (mg/L) son concentraciones de TNT en tiempo 0 y t, respectivamente. Además, t es el tiempo y k_1 y k_2 son las constantes de velocidad de reacción para la biodegradación de TNT (h^{-1}).

3.2.5.3. Determinación de nitrito (NO_2^-)

El ensayo de nitrito se realizó según Seth-Smith (2002). La detección de NO_2^- se realizó colorimétricamente, por medio de la reacción de Griess. Para ello, se preparó la solución NED, preparada con 0.2 g de N-(1-naftil)-etilendiamina en 150 mL de ácido acético al 15 % (v/v); y la solución de ácido sulfanílico, preparada con 0.5 g de sulfanilamida en 150 mL de ácido acético al 15% (v/v). Para determinar la concentración de nitritos se mezcló 1 mL del sobrenadante de cada muestra, 0.4 mL de solución de ácido sulfanílico y 0.2 mL de solución de N-naftiletilendiamina (NED), midiendo las muestras a 540 nm, siendo el blanco el reactivo. Para cuantificar la concentración de nitrito se generó una curva estándar de nitrito de sodio de concentración conocida.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de tolerancia de cepas de levaduras al TNT

4.1.1. Efecto del TNT sobre el crecimiento celular de levaduras nativas

El crecimiento celular, de las 29 cepas evaluadas, se vio afectado por el incremento de la concentración de TNT, lo cual podemos observar en la Figura 7 (la línea roja indica la D.O inicial). La menor concentración evaluada, 200 mg/L de TNT, no presentó una inhibición en el crecimiento, ya que el 100 % de las cepas mostraron una densidad óptica 5 veces mayor que el inicial (0.5 a 2.5 DO) a las 72 h. Sin embargo, a medida que incrementamos la concentración del tóxico, la inhibición en el crecimiento celular se evidenció. Se observó que a concentraciones de 500 mg/L, sólo el 34 % de las cepas lograron una densidad de crecimiento mayor a 2.5 DO. Mientras que, a 1000 mg/L de TNT el porcentaje de cepas, con un crecimiento mayor a 2.5 de DO, fue de 28 %. Por último, sólo cinco cepas mostraron crecimiento a la concentración de 1500 mg/L; la cepa 8TS-500Z con 2.9 de DO, 9TS-500-1 con 2.5 de DO, MD3-S1 con 2.5 de DO, MD10-A1 con 3.2 de DO y MD10-A3 con 2.2 de DO. Además, a concentraciones de 1000 y 1500 mg/L de TNT el crecimiento del 52 % y 62 % respectivamente, de las cepas evaluadas, mantuvo la densidad óptica inicial (0.5 DO).

Éstos resultados reflejarían el efecto citotóxico (sin reanudación del crecimiento) y/o citoestático (reanudación del crecimiento) del TNT sobre el crecimiento celular (Weber et al., 2002). Asimismo, la alta tolerancia de las cepas de levadura podría contribuir a su rendimiento en la degradación del TNT, ya que la eficiencia de la remediación microbiana de TNT está limitada tanto por factores de tasa de degradación y tolerancia, los cuales en la mayoría de los casos están relacionados (Serrano-González *et al.*, 2018). Como se muestra en los estudios de Weber et al., donde los hongos mitospóricos, *Acremonium*, *Cylindrocarpon*, *Gliocladium* y

Trichoderma, fueron muy tolerantes al tóxico de TNT (1000 mg/L) y además, poseían una gran capacidad para biotransformar éste compuesto (Weber *et al.*, 2002). La similar tolerancia a TNT por las levaduras evaluadas en éste estudio al trabajo de Weber podría dar luz a una posible fuente de microorganismos con gran eficiencia de remediación.

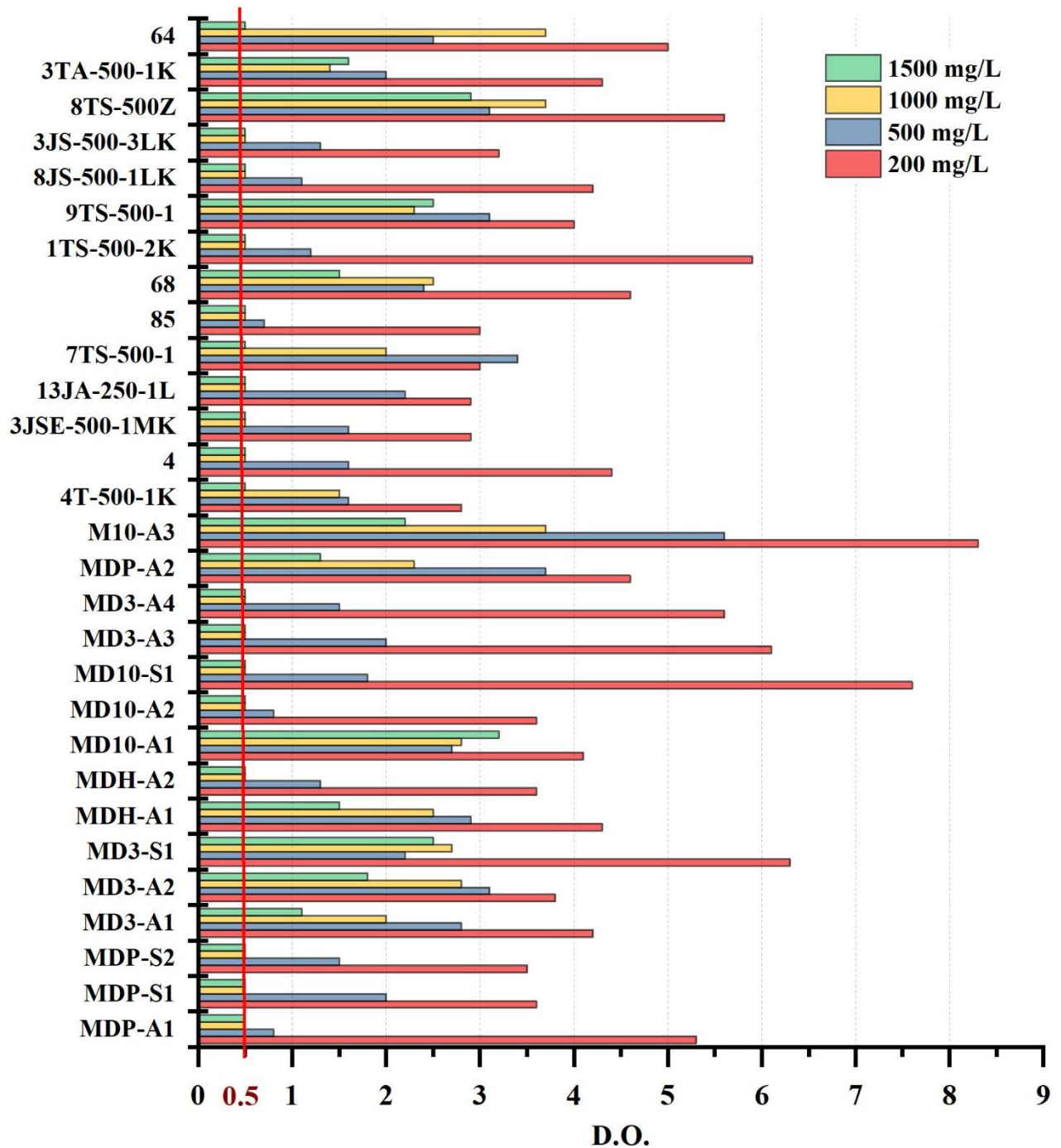


Figura 7. Crecimiento de 29 cepas de levaduras frente a diferentes concentraciones de TNT. La línea roja indica la D.O. inicial. Crecimiento evaluado con densitómetro DEN-1 BIOSAN.

Por otro lado, el hongo *P. cryosporium* presenta una baja tolerancia al TNT, debido que, a concentraciones por encima 20 mg/L el crecimiento de éste hongo es inhibido. Su baja tolerancia lo indica como un no buen candidato para la remediación de TNT (Esteve-Núñez et al., 2001). De igual modo, la baja tolerancia a TNT de *E. coli* se ha dado a conocer a rangos múltiples que varían de 66 a 200 mg (Serrano-González et al., 2018). Resultando concentraciones bajas en comparación con las cepas de levaduras evaluadas por nosotros.

La diferencia de la tolerancia sobre el efecto del TNT en el crecimiento celular, en cada una de las cepas de levaduras estudiadas, puede deberse a que cada una de ellas genera diversos subproductos no tóxicos, tóxicos y/o altamente tóxicos, según la ruta metabólica presentada. Es así que, los posibles subproductos generados puedan ser letales o inactivar a las levaduras (Serrano-González et al., 2018; Smets et al., 2007; Zaripov et al., 2002).

4.1.2. Efecto del TNT sobre la morfología celular de levaduras nativas

Al enfrentar las 29 cepas de levaduras con TNT, se observó que 15 cepas de ellas no presentaron una respuesta hacia el TNT, puesto que no se observó un cambio morfológico. Además, la mayoría de ellas fueron levaduras que obtuvieron baja tolerancia al TNT, manteniendo probablemente un comportamiento citostático y/o citotóxico.

Las 14 cepas de levaduras restantes presentaron diversos cambios morfológicos, como se puede apreciar en la Tabla 3 y 4, coincidiendo con las de mayor tolerancia al tóxico. Las cepas en ausencia de TNT presentaron crecimiento levaduriforme, células ovoides y/o esféricas; mientras que, a 100 mg/L de TNT mostraron cambios en su estado morfológico de micelio y/o pseudomicelio. Por lo tanto, el uso de TNT como una fuente de nitrógeno podría generar efectos implicados en la transición dimórfica de las levaduras. Éstos cambios pueden ser una respuesta frente al TNT, el cual sería el estímulo de estrés ambiental que desencadenaría un patrón de crecimiento y cambios en la característica de la pared celular tanto en sus componentes lipídicos como proteicos y de polisacaridos (Khilyas et al., 2017; Whiteway & Bachewich, 2007).

Sin embargo, el TNT no es el único protagonista en el estímulo del estrés ambiental, pues su degradación genera subproductos que podrían ser capaces de intervenir como agente para la transición morfológica (Khilyas *et al.*, 2017). Además, el estrés ambiental, en levaduras, puede darse por limitación de nutrientes, cambios de temperatura externa, osmolaridad, humedad, el pH y la exposición a toxinas (Gasch, 2007; Palande et al., 2014). Los diferentes patrones morfológicos, desarrollados por nuestras cepas de levaduras, muestran las transiciones de levadura, pseudomicelio y micelio. Las transiciones morfológicas se encuentran relacionadas a determinados factores ambientales, los cuales activarían diferentes rutas de transducción de señal. Es decir, proteínas de la superficie celular detectarían la ausencia o presencia del nutriente, activando la señal de transducción en diferentes compartimentos celulares, los cuales controlan los cambios en la fosforilación y actividad proteica. Estas rutas pueden converger en factores de transcripción que regulan la expresión de genes diana responsables de la transición morfológica (Gasch, 2007; Martinez-Vazquez et al., 2013; Whiteway & Bachewich, 2007)

Por otro lado, en la Figura 8 se muestra imágenes al microscopio electrónico de barrido (MEB). de la cepa 8TS-500Z, en la cual podemos observar, a mayor detalle, las transiciones morfológicas que ocurren al añadir TNT como fuente de nitrógeno. El desarrollo morfológico observado resultó heterogéneo (levadura, micelio y pseudomicelio) frente a 100 mg/L de TNT. En **a)** y **b)** las cepas sometidas a 0 mg/L de TNT denotaron crecimiento en forma de levadura, además de observar claramente la aparición de la gema inicial a partir de la célula de levadura (↓). En **c)** y **d)** las cepas sometidas a 100 mg/L de TNT, la diferencia entre estas imágenes es el patrón morfológico que presentan las levaduras. La imagen **d)** presenta levaduras con un desarrollo de micelio verdadero, delgadas paredes paralelas sin constricción en el sitio de la tabicación (↓); mientras que en **e)** y **f)**, se muestra una morfología de pseudomicelio, que son células alargadas que permanecen unidas después de la citocinesis, formando cadenas ramificadas, y separadas por una constricción verdadera (↓)..

Tabla 3. Morfología de cepas de levaduras mediante microscopía óptica, técnica de tinción Gram.


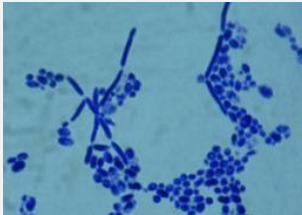
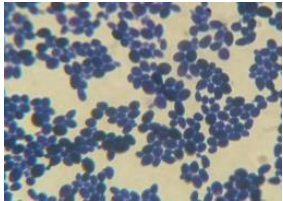
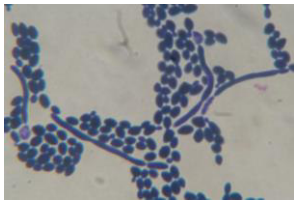
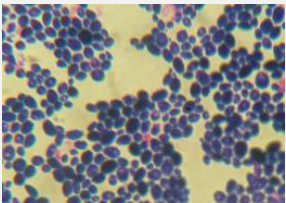

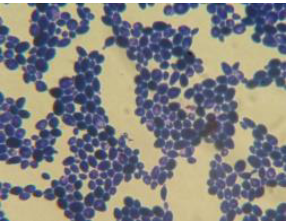

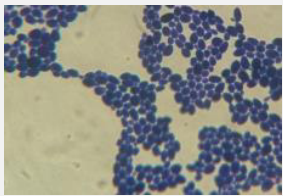

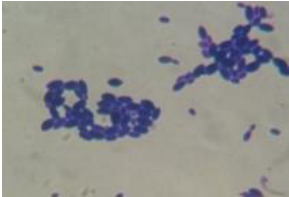


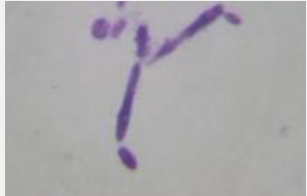


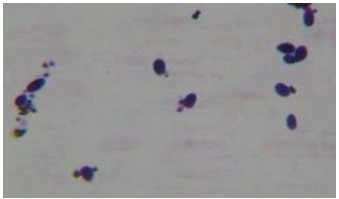

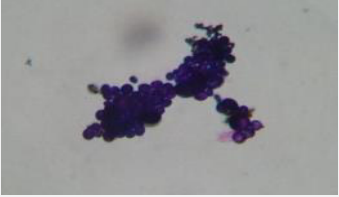
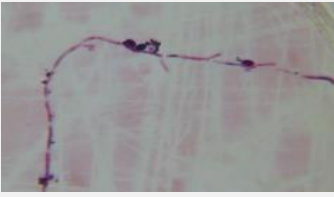
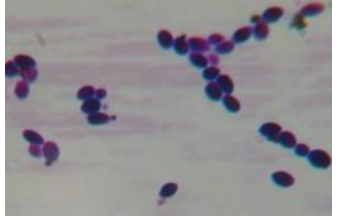
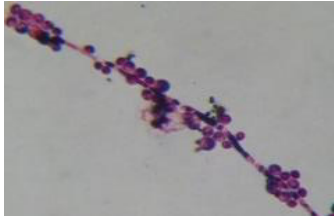


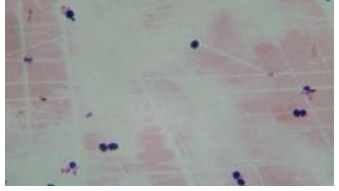



Código de Cepas	Medio de cultivo sin TNT	Medio de cultivo con TNT (100 mg/L)
MD3-A2		
MD3-S1		
MDH-A1		
MD10-A1		
MDP-A2		
MD10-A3		
7TS-500-1		

Tabla 4. Morfología de cepas de levaduras mediante microscopía óptica, técnica de tinción Gram. Continuación.

Código de Cepas	Medio de cultivo sin TNT	Medio de cultivo con TNT (100 mg/L)
68		
1TS-500-2K		
9TS-500-1		
8JS-500-1LK		
8TS-500Z		
3TA-500-1K		
64		

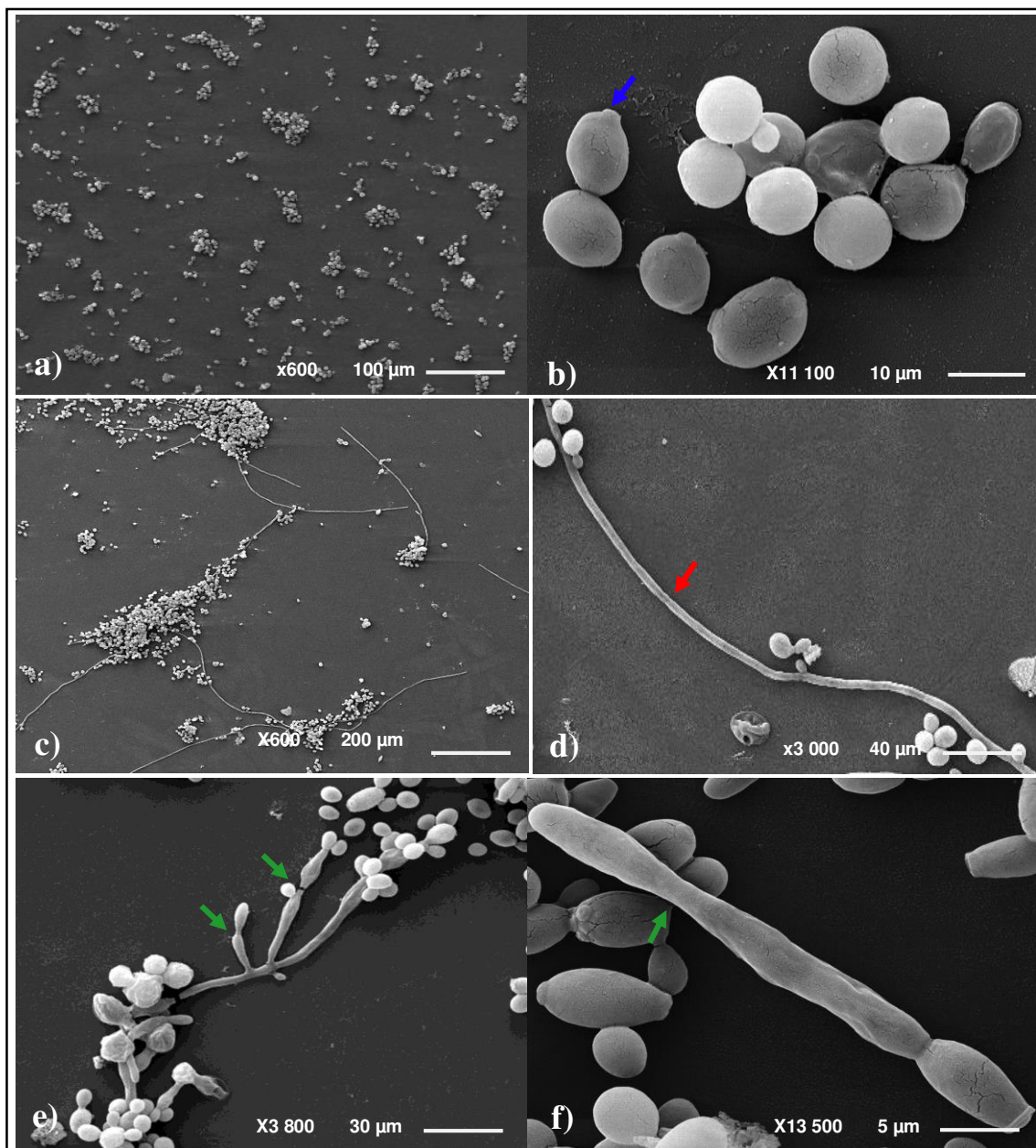


Figura 8. Morfología de la cepa *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z mediante microscopía electrónica de barrido (MEB): **a)** Morfología de levadura sin TNT a 600 aumentos y **b)** a 11100 aumentos, flecha azul (↓) indica la gema (célula hija). Capacidad de filamentización a 100 mg/L de TNT, **c)** a 600 y **d)** a 3 000 aumentos, flecha roja (↓) indica tabicación sin constricción. Formación de pseudomicelio 100 mg/L de TNT, **e)** a 3 800 y **f)** a 13 500 aumentos, flecha verde (↓) indica constricción verdadera formando cadenas ramificadas, y separadas.

4.2. Identificación Molecular

La poca precisión de la identificación de especies generada por las interpretaciones de los métodos tradicionales y la identificación rutinaria, que

dependen del fenotipo, hacen del análisis secuencial de la filogenia un método más preciso para determinar relaciones intra e interespecíficas (Barbedo et al., 2017; Kurtzman & Fell, 2006). Por tanto, se realizó la identificación molecular de las cepas, con mayor tolerancia a altas concentraciones de tóxico TNT, codificadas como 8TS-500Z, MD3-S1, MD10-A1 y MD10-A3. El ADN extraído, de las cepas seleccionadas, fue usado para amplificar por PCR la región D1/D2 del gen LSU 28S rDNA. Nosotros obtuvimos amplificados con un tamaño aproximado de 600 pb, tal como se esperaba (Barbedo *et al.*, 2017; Orbegozo *et al.*, 2008), que indica la amplificación exitosa de la región D1/D2 del gen LSU 28S rDNA de las cuatro cepas de levaduras seleccionadas (Figura 9).

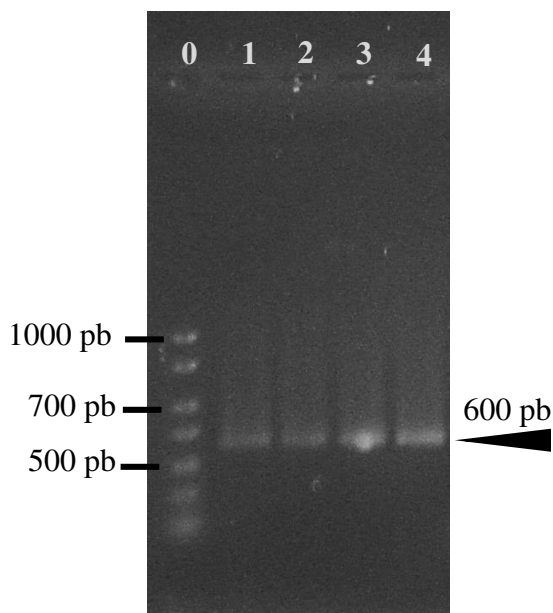


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del amplificado por PCR de la región D1/D2 del gen LSU 28S rDNA LSU. En el carril 0, marcador de 1 Kb, Promega®. En los carriles 1-4, amplificados de las levaduras que degradan TNT (600 bp).

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas para obtener secuencias consenso, con las que se trabajó posteriormente. Se realizó la comparación de las secuencias con otras existentes en la base de datos del NCBI. La búsqueda mediante el programa BLAST confirmó la identidad de los aislados con 99 % de identidad que nos indica que 8TS-500Z pertenece a la especie *Candida orthopsilosis*, MD3-S1 a *Candida maltosa*, MD10-A1 a *Candida maltosa* y MD10-A3 a *Debaryomyces hansenii* (Tabla 5).

Tabla 5. Especies y porcentaje de identidad a nivel molecular de las cepas de levaduras seleccionadas.

Cepa	Especies relacionadas	Score	Valor E	Gap (%)	Identidad (%)
8TS-500Z	<i>Candida orthopsilosis</i> (KY000091.1)	1096	0.0	0	99
MD3-S1	<i>Candida maltosa</i> (HM627098.1)	1081	0.0	0	99
MD10-A1	<i>Candida maltosa</i> (AB034685.1)	1079	0.0	0	99
MD10-A3	<i>Debaryomyces hansenii</i> (MF148878.1)	1081	0.0	0	99

El análisis filogenético basado en el gen ribosomal 28S de las cepas seleccionadas, evidencia la pertenencia de cada una de las especies. *Saccharomyces cerevisiae* Y-12632 se usó como elemento fuera del grupo para construir el árbol filogenético.

La topología del filograma en la Figura 10, confirma que las cepas MD3-S1 y MD10-A1 se encuentran muy relacionadas con *Candida maltosa*, las cuales se encuentran dispuestas en un clado robusto, estas tuvieron un valor de *bootstrap* del 100 %. La cepa 8TS-500Z fue asignada a *Candida orthopsilosis* obtuvo un porcentaje de *bootstrap* de 100 %, la cual se encuentra bien posicionada dentro del *cluster* de *Candida orthopsilosis*. La cepa MD10-A3 se encuentra en un clado robusto relacionado a la especie *Debaryomyces hansenii*, obteniendo un porcentaje de *bootstrap* de 100 %.

Existen numerosos estudios que usan los primeros 600-900 pb de la LSU del gen 28S rDNA, que comprende tres dominios divergentes (D1, D2 y D3) para tipificar especies de levaduras (Barbedo *et al.*, 2017; Jamali *et al.*, 2016; Kurtzman, 2006; Orbegozo *et al.*, 2008). Siendo los dominios D1/D2 seleccionados debido a su alta variabilidad genética, en contraste con el resto de la LSU, que es en gran medida invariante a través de taxones ampliamente divergentes (Barbedo *et al.*, 2017; Jamali *et al.*, 2016). En nuestro estudio, las secuencias de los dominios D1/D2 de la LSU del gen 28S rDNA permitieron la discriminación entre las especies de levaduras de *Candida maltosa*, *Candida orthopsilosis* y *Debaryomyces hansenii*.

A pesar de que muchas especies de levaduras han sido identificadas como degradadoras de TNT (Claus, 2014; Serrano-González *et al.*, 2018; Ziganshin & Gerlach, 2014), los resultados obtenidos en este estudio indican que todas las cepas encontradas fueron especies nuevas de levaduras con esa capacidad de remediación. Por lo cual, las cepas identificadas prometen gran capacidad y potencial para tratar ambientes contaminados con el tóxico TNT.

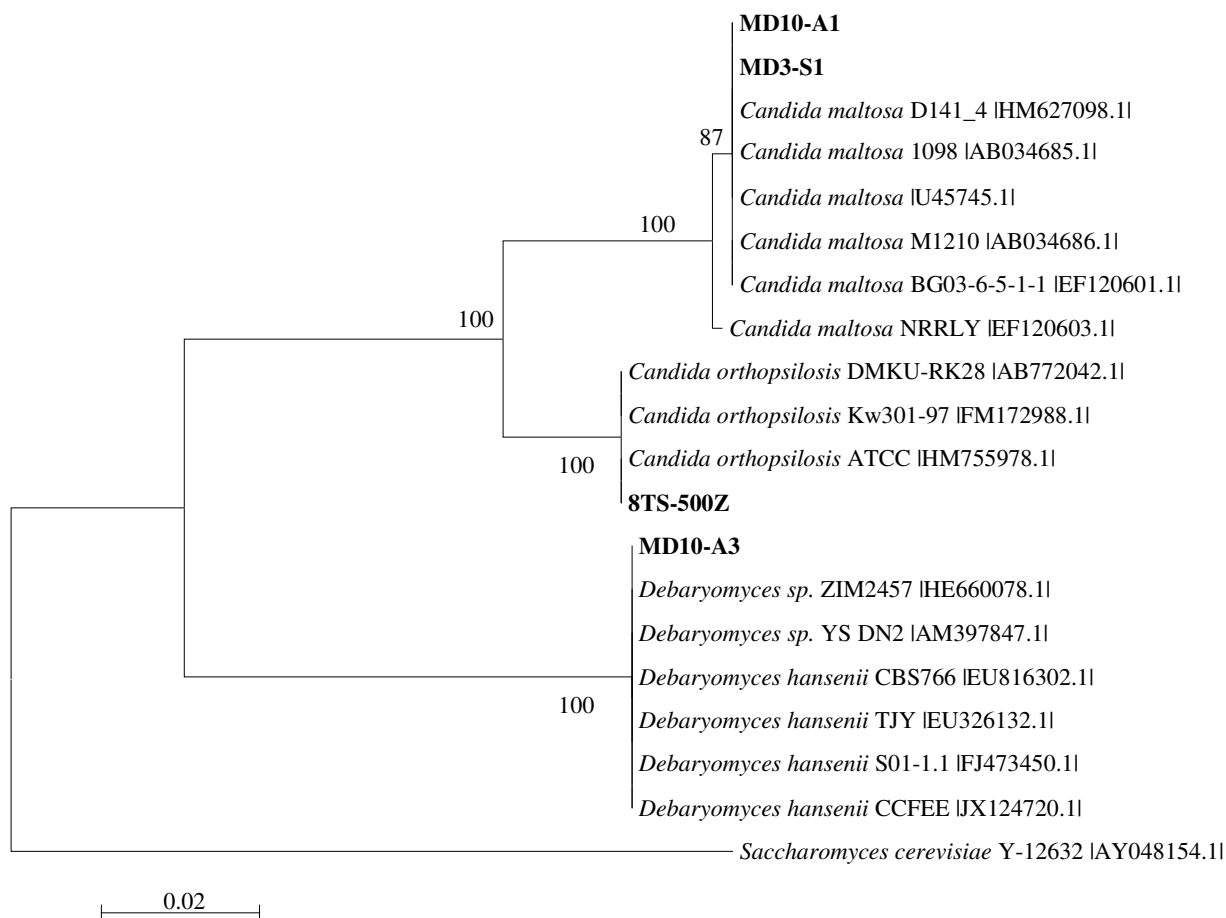


Figura 10. Árbol filogenético NJ de las cepas basado en la secuencia del gen 28S rDNA de levaduras ascomicetas. Los valores de *bootstrap* son mostrados como porcentaje de 1000 réplicas en el punto de ramificación.

4.3. Evaluación de la remoción de TNT por levaduras tolerantes

La evaluación de la degradación de TNT se realizó con las cepas con mayor tolerancia a altas concentraciones del tóxico TNT, *Debaryomyces hansenii* MD10-A3, *Candida maltosa* MD3-S1, *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z, *Candida maltosa*

MD10-A1 y *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1, cepa identificada por Medina Canzio (2009). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, más la adición de un blanco, obteniendo un total de 16 unidades experimentales.

En la Figura 11 se puede observar el comportamiento cualitativo de los tratamientos. El medio de cultivo presenta cambios de colores durante las 48 h de incubación. El cambio de color del medio es desde un líquido incoloro a un rojo pardo, y desde éste a amarillo o naranja. El cambio de color de incoloro a rojo pardo ocurrió a las 12 horas de incubación; sin embargo, la intensidad del color es diferente en cada cepa de levadura evaluada. Es así que, los medios de cultivo con cepas *Candida maltosa* MD3-S1, *Candida maltosa* MD10-A1 y *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1 presentan el color rojo pardo con mayor intensidad a las 12 h; el cultivo con la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 fue a las 24 h; y el medio de cultivo con la cepa *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z no incrementó la intensidad de color rojo a lo largo del tiempo de incubación. Por otro lado, el cambio de color del medio de rojo pardo a amarillo o naranja en los medios de cultivo ocurre a las 48 h con las cepas *Candida maltosa* MD3-S1, *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z y *Candida maltosa* MD10-A1; a las 60 h con la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 y el medio con la cepa *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1 mantuvo el color rojo pardo durante todo el tiempo de incubación; sin embargo, la intensidad disminuyó levemente a las 72 h.

Durante la degradación de TNT por *S. typhimurium*, el medio se tornó de color rojo pardo a las 10h de incubación, pero desapareció al continuar con el tiempo de incubación (Litake et al., 2005), un comportamiento similar al medio de cultivo con nuestras cepas de levaduras. Así mismo, la cepa de *P. aeruginosa*, cambió de color del medio alrededor de 10-12 h de incubación, manteniendo el color rojo pardo intenso por un periodo prolongado (Mercimek et al., 2015) como el caso de la cepa *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1. Un reporte con la levadura *Yarrowia lipolytica* AN-L15 menciona el cambio de color del medio a rojo oscuro a las 24 h y a amarillo o naranja a las 120 h, similar al comportamiento de las cepas evaluadas en este estudio (Pannier, 2009).

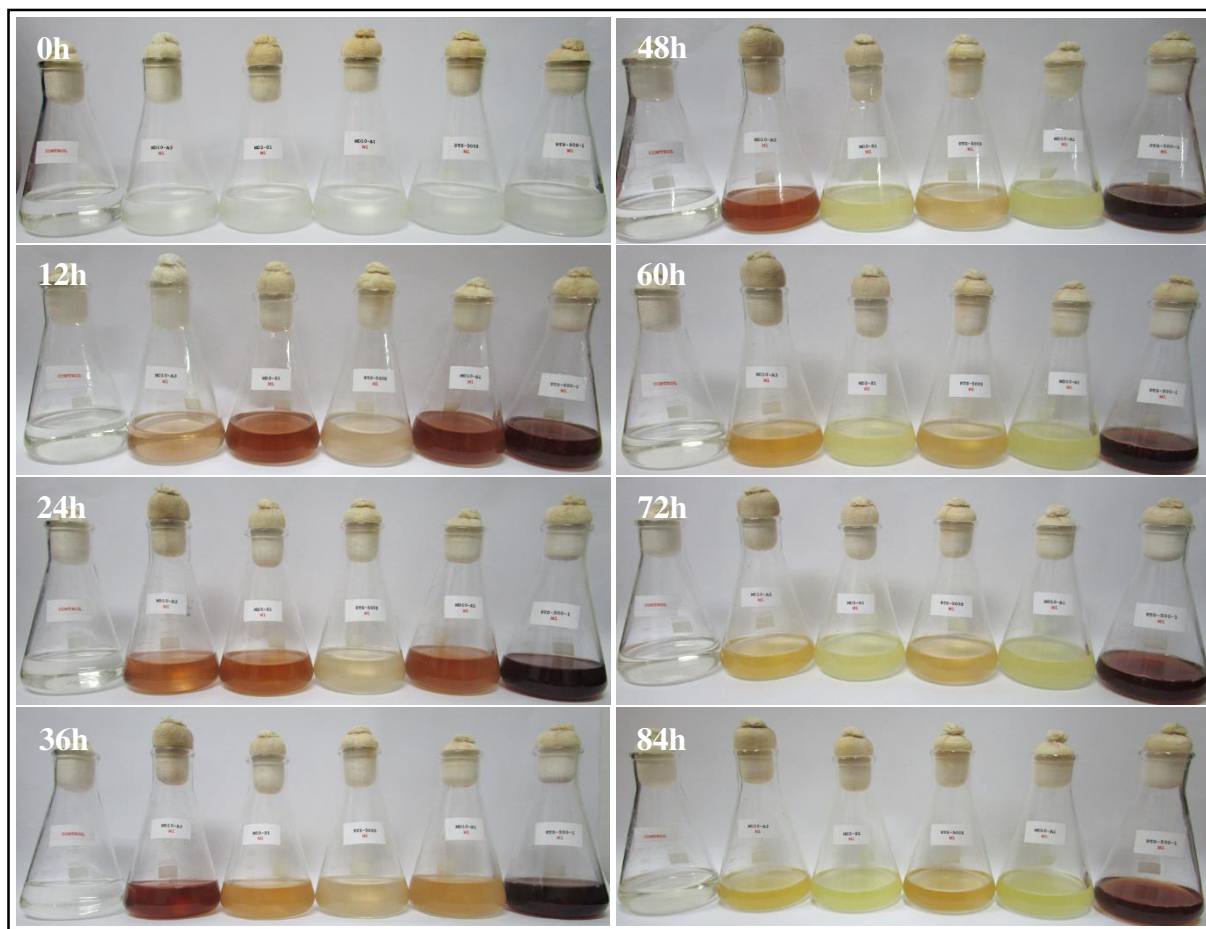


Figura 11. Unidades experimentales en la remoción de TNT a 200 mg/L, en medio de cultivo sintético a pH 6.5, 120 rpm y 25 °C \pm 3 °C por 84 horas. Los experimentos de izquierda a derecha: blanco, cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3, *Candida maltosa* MD3-S1, *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z, *Candida maltosa* MD10-A1 y *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1.

El cambio de color del medio indicaría la formación de complejos Meisenheimer (Litake *et al.*, 2005; Mercimek *et al.*, 2015; Ziganshin *et al.*, 2007a; Ziganshin *et al.*, 2007b), los cuales son generados en la vía de reducción del anillo aromático del TNT, siendo ésta una ruta de mineralización total del TNT por levaduras (Pannier, 2009; Ziganshin & Gerlach, 2014; Ziganshin *et al.*, 2007b) y otros microorganismos (Claus, 2014; Litake *et al.*, 2005; Mercimek *et al.*, 2015). El monitoreo de la presencia de complejos hidruro y dihidruro-Meisenheimer durante el cambio de color del medio en la biodegradación de TNT indican que el color rojo pardo es debido a la transformación del TNT a un monohidruro-Meisenheimer (3-H⁻-TNT o 1-H⁻-TNT) y el color rojo pardo a amarillo o naranja es dado por la transformación de 3-H⁻-TNT a dihidruro y dihidruro-Meisenheimer protonado (3,5-2H⁻-TNT y 3,5-2H⁻-TNT·H⁺) (Litake *et al.*,

2005; Pannier, 2009); que finalmente conducen a la eliminación de grupos nitro de los sistemas aromáticos así como la posible destrucción del esqueleto aromático del TNT hasta su mineralización (Mercimek *et al.*, 2015; Ziganshin & Gerlach, 2014). Sin embargo, los estudios de biodegradación de Nyanhongo et al. (2009), mostraron el cambio de coloración del medio a rojo oscuro a subproductos como 2-Aminodinitrotolueno (2-AMDNT) y 4-Aminodinitrotolueno (4-AMDNT); además de un color violeta a 2,6-diamino-4-nitrotolueno; siendo éstos productos característicos de la ruta de degradación por reducción del grupo nitro de la molécula del TNT.

Por lo tanto, el cambio de coloración del medio de cultivo no indica la ruta metabólica presentada por nuestras cepas de levaduras; más si resulta una evidencia, cualitativa, importante de la capacidad de éstas en la degradación del TNT. Sin embargo, se debe determinar la concentración de TNT para demostrar, de manera cuantitativa, la remoción por las levaduras seleccionadas. El desarrollo de técnicas analíticas, para determinar la concentración de TNT, son muy importantes entre ellas se encuentran técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, high-performance liquid chromatography) y de espectrofotometría, bajo la formación moléculas con un espectro de absorción en la región visible. Es así que, nosotros optamos por el uso del método de espectrofotometría por ser una alternativa simple, rápida y económica.

La concentración de TNT en las muestras, por el método espectrofotométrico, se determinó mediante la realización de una curva de calibración con una solución patrón de TNT de concentración conocida. En la Figura 12, se observa la ecuación lineal que se obtuvo:

$$y = 0.0421 x - 0.0709$$

Determinamos los parámetros de regresión lineal; el coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.997, el coeficiente correlación (R) fue 0.999; para cinco niveles de concentración. El valor de la pendiente fue 0.0421 ± 0.0013 y el intercepto con el eje “y” fue -0.0709 ± 0.0271 .

La Tabla 15, anexo, muestra los valores ANOVA de un factor, generando las siguientes hipótesis para determinar la linealidad del método.

H₀: No hay relación lineal, $m = 0$

H₁: Hay relación lineal, $m \neq 0$

Al ser el valor crítico de F menor al F hallado, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa; por lo tanto, hay linealidad.

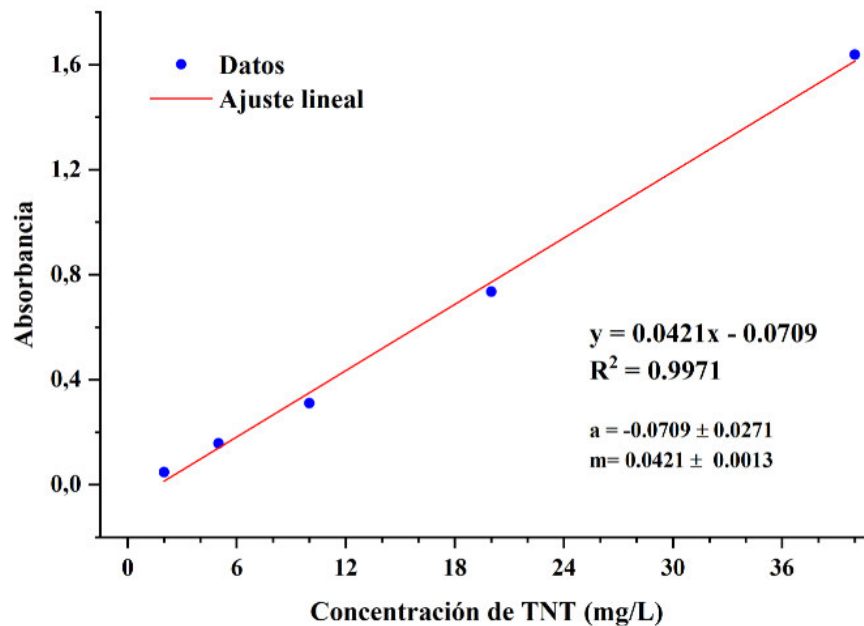


Figura 12. Regresión lineal de la curva de calibración de TNT.

En la Figura 13 se muestra gráficamente los promedios y desviaciones estándar del porcentaje de TNT degradado por 5 de nuestras cepas de levaduras. Dentro de las 84 horas de cultivo, los valores más altos de remoción se lograron con las cepas *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 y *Candida maltosa* MD3-S1 con $71.1 \pm 0.5 \%$ y $67.7 \pm 2.6 \%$ de tóxico removido, respectivamente. Mientras que, los porcentajes más bajos se obtuvieron con las cepas *Candida maltosa* MD10-A1, *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1 y *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z con $57 \pm 4.1 \%$, $52.6 \pm 1.2 \%$ y $47.4 \pm 3.1 \%$, a correspondencia. Estas diferencias, entre los experimentos, en la eficiencia de degradación, se relacionan principalmente por la cepa empleada en cada unidad experimental. Cada especie y género de microorganismos presentan diferentes mecanismos de degradación frente a compuestos orgánicos recalcitrantes; y por consecuencia una diferencia en la eficiencia.

Estudios anteriores reportan una mayor eficiencia de degradación de TNT por cepas de levaduras con los mismos géneros identificados en éste trabajo. Uno de ellos presenta a la cepa de *Candida sp.* AN-L15 con una eficiencia del 89 % a las 55 h de incubación en medio sintético con 100 mg/L de TNT a pH 7. (Ziganshin *et al.*, 2007b). El reporte con la cepa de levadura *Yarrowia lipolytica* AN-L15 presenta una eficiencia de remoción de TNT del 92 % durante las primeras 18 h de incubación en medio de cultivo sintético con 100 mg/L de TNT a pH 6 (Ziganshin *et al.*, 2010b). Por otro lado, existe la posibilidad de incrementar la eficiencia de remoción de TNT mediante la adición o reducción de fuentes nutricionales en el medio de cultivo. La investigación de remoción de TNT por la cepa *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, muestra el efecto del medio de cultivo en la remoción de TNT. Los autores lograron incrementar su eficiencia de remoción a medida agregaban o privaban las fuentes de nitrógeno y carbono al medio Base Levadura-Nitrógeno. En medios con carencia de nutrientes obtuvieron un porcentaje de degradación del 5 % de TNT pasadas las 96 h, en medios con fuente de carbono obtuvieron el 20 % de degradación después de las 96 h y en medio enriquecido de glucosa y otras fuentes de nitrógeno no se detectó TNT a las 48 h, sugiriendo una total degradación (Jain *et al.*, 2004).

Por lo tanto, podemos incrementar la capacidad de nuestras cepas de levaduras para la degradación de TNT encontrando el suplemento necesario que las lleve a una adecuada eficiencia. Además, no existe evidencia reportada de cepas de *Debaryomyces hansenii* en el empleo de TNT, siendo la cepa de levadura con mayor capacidad de remoción en ésta investigación.

La diferencia en la capacidad de remoción de TNT también es presentada en bacterias. La bacteria Gram negativa como *Pseudomonas aeruginosa* presenta un menor porcentaje de remoción de TNT al compararlo con los resultados obtenidos por nuestras cepas de levaduras. La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* degradó 46 % y 59 % de 50 y 75 mg/L de TNT, respectivamente, durante un período de tiempo de 96 h, en medio mínimo de sales a pH 7.5 (Mercimek *et al.*, 2015). Además, la bacteria Gram positiva *Bacillus cereus* degradó 50 y 75 mg/L de TNT con un porcentaje de remoción de 68 % y 77 %, respectivamente, en medio mínimo de sales a pH 7.5, a las

96 h de incubación (Mercimek *et al.*, 2013). Los porcentajes fueron similares a nuestras cepas de levaduras, que presentaron mayor porcentaje de remoción; sin embargo, las concentraciones iniciales de TNT en cada estudio evidencian la gran capacidad de las cepas de levaduras seleccionadas.

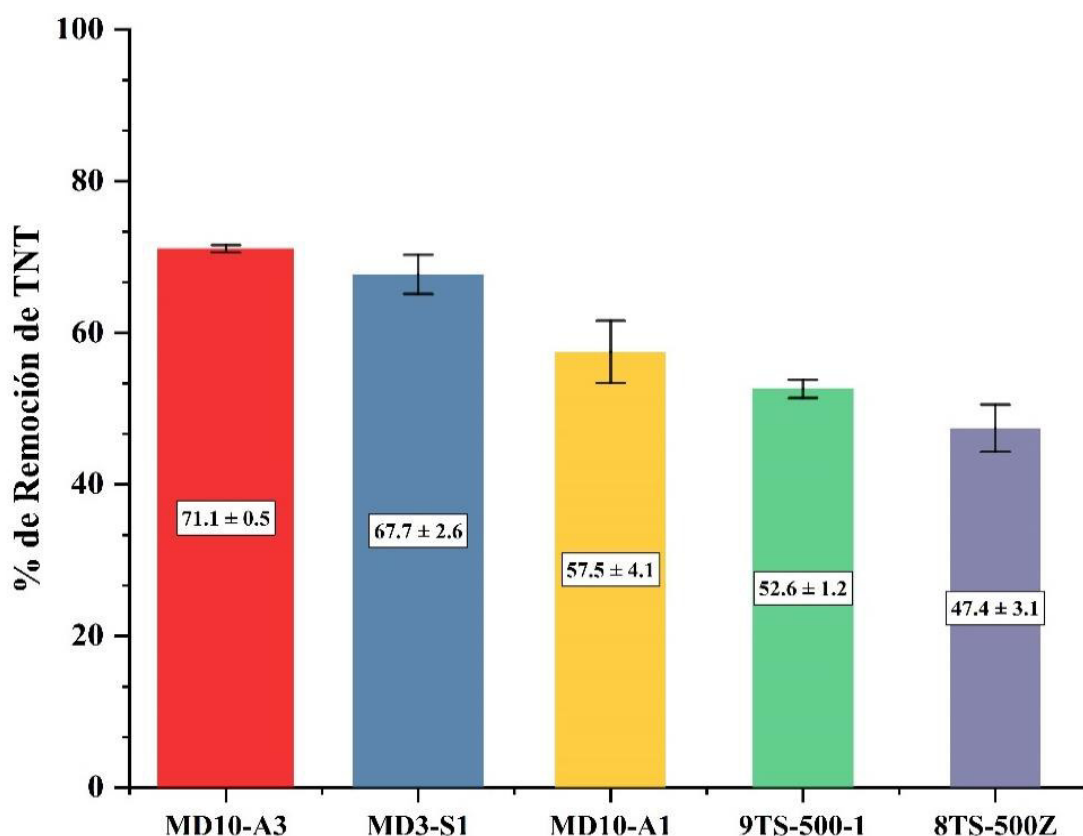


Figura 13. Porcentaje de remoción de TNT a 200 mg/L, en medio de cultivo sintético a pH 6.5, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C por 84 horas.

4.3.2. Cinética de degradación de TNT

Para la realización de la cinética de degradación se cuantificó la cantidad de 2,4,6,-trinitrotolueno residual en los cultivos de cepas de levaduras, mediante ensayo espectrofotométrico. La Figura 14 nos muestra la variación de la concentración de 2,4,6,-trinitrotolueno en las distintas unidades experimentales establecidas durante 84 horas de incubación. La toma de muestra se realizó en 8 puntos cada 12 horas, incluyendo el punto cero. Se puede observar que, en todos los ensayos establecidos, la concentración de TNT presenta una tendencia a disminuir a medida que el tiempo de incubación incrementa, hasta las 72 horas, para posteriormente mantenerse constante.

Ninguna cepa logra degradar en su totalidad el tóxico TNT; sin embargo, el alto porcentaje de eficiencia de remoción de TNT evidencia la capacidad de nuestras cepas frente al tóxico TNT, como se discutió anteriormente.

Según la Figura 14, las cepas *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 y *Candida maltosa* MD3-S1 presentan una disminución gradual de concentración de TNT. Mientras que, en los ensayos con las cepas *Candida maltosa* MD10-A1, *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1 y *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z, como el ensayo control, se observa un incremento de concentración de TNT en dos puntos de incubación, a las 36 y 60 horas. Este comportamiento de degradación es debido, posiblemente, a que subproductos generados en la degradación de TNT vía reducción del anillo aromático, especialmente monohidruros Meisenheimer, se convierten nuevamente en TNT a través de una reacción de desproporción redox (Ziganshin & Gerlach, 2014; Ziganshin *et al.*, 2010b). Esto fue explicado por Ziganshin *et al.* (2007a), quienes comprobaron la conversión abiótica de 3-H-TNT a TNT y otros compuestos derivados de su isomerización y desproporción redox. Por lo tanto, éstos compuestos pudieron ser detectados por nuestro método como un incremento en la concentración de TNT. Debido a que, la mezcla de éstos compuestos podría haber causado un incremento en la intensidad de absorbancia, sumados a la concentración de TNT que aún permanecía en el medio de cultivo como remanente.

Además, podemos observar la disminución en la concentración de TNT en el ensayo control, debido a la alta sensibilidad del TNT por la fotodegradación, especialmente en la región UV profunda (>295 nm) (Castellanos *et al.*, 2016; Luning *et al.*, 2017; Sisco *et al.*, 2015). Lo cual podría implicar la transformación de TNT en un metabolito encontrado en la fotólisis, particularmente de 2-amino-4,6-dinitrotolueno (2-ADNT) (Sisco *et al.*, 2015) y 2,4,6-trinitrobenzaldehído, 1,3,5-trinitrobenceno, ácido 2,4,6-trinitrobenzoico y ácido 2-amino-4,6-dinitrobenzoico (Luning *et al.*, 2017). Sin embargo, la reducción del TNT en el control se da paulatinamente, probablemente a la exposición de las muestras a longitudes de onda del rango correspondiente al límite con la luz visible presente en el ambiente de laboratorio (>395 nm).

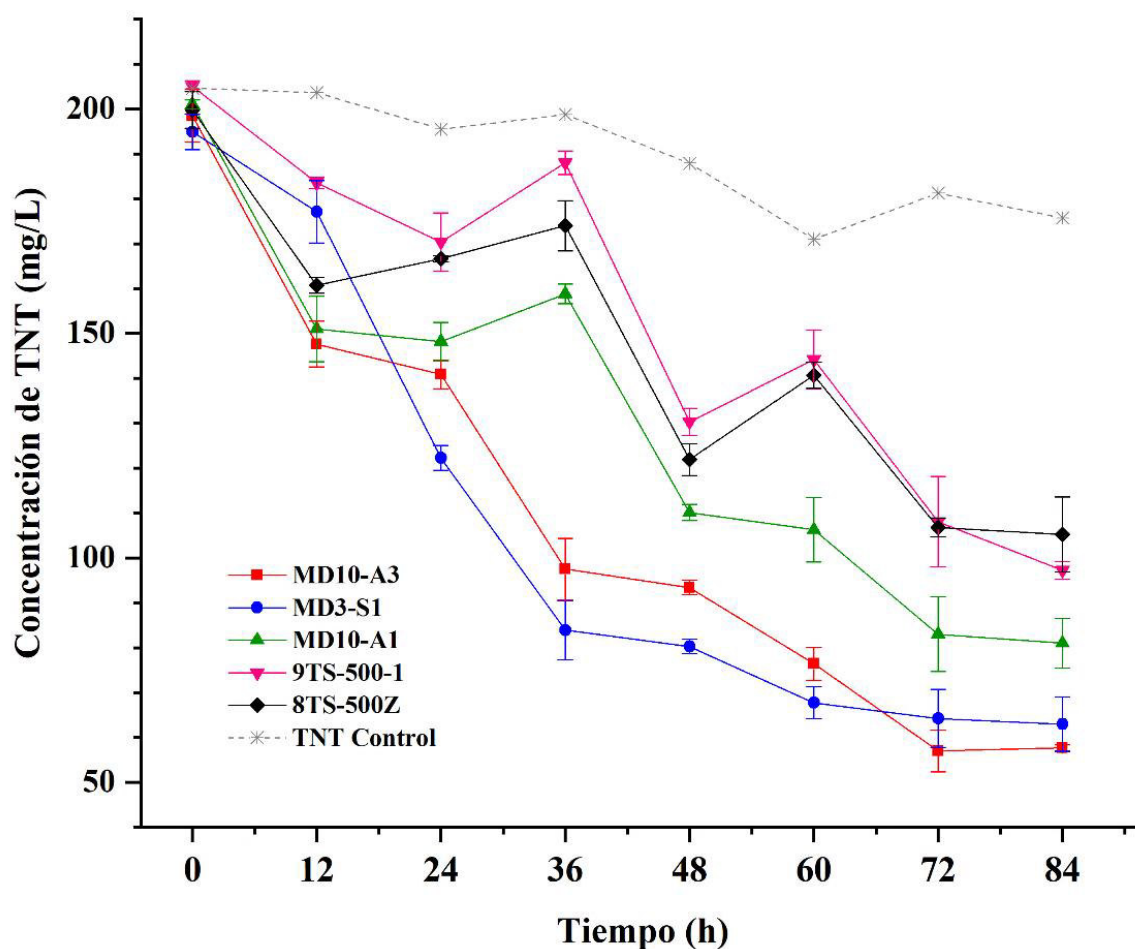


Figura 14. Remoción de TNT a 200 mg/L, en medio de cultivo sintético a pH 6.5, 120 rpm y 25 °C \pm 3 °C por 84 horas; por acción de cepas de levaduras nativas.

La evaluación de la cinética de degradación de TNT fue realizada mediante el uso de modelos cinéticos de primer y segundo orden (ver Tabla 6). Los valores de coeficientes de correlación r^2 obtenidos por ajuste del modelo de primer orden son mayores a los obtenidos por el de segundo orden. La cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 obtuvo un valor de coeficiente de correlación mayor en ambos modelos cinéticos. Sin embargo, el modelo cinético de primer orden fue el que más se ajustó, pues el coeficiente de correlación se encontraba cercano a la unidad ($r^2 = 0.9735$), por lo que los valores teóricos predecibles con éste modelo propuesto son muy próximos a los obtenidos experimentalmente. Además, las cuatro cepas de levaduras restantes obtuvieron coeficientes de correlación bajos, en ambos modelos cinéticos propuestos, indicando que no se obtuvo un buen ajuste de datos. El bajo ajuste de los modelos cinéticos es debido a que éstos no contemplan la existencia de periodos o fases que las

levaduras presentan en la curva de crecimiento mediante el uso del sustrato, mucho menos efectos de otros factores involucrados en la degradación del TNT.

En la Tabla 6 se muestra, además, los valores de las constantes de velocidad de reacción k (h^{-1}), que permite comparar el potencial de las cinco cepas de levaduras en la remoción de TNT; mientras estos valores sean altos, mayor será la capacidad de degradación de TNT por las cepas de levaduras. Durante el ajuste del modelo cinético de primer orden dos de nuestras cepas de levaduras presentaron gran capacidad de remoción. Entre ellas se encuentra la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3, quien obtuvo el valor de $0.0159 \pm 0.0012 \text{ h}^{-1}$ ($r^2=0.9735$), el cual fue el más alto. Así mismo, la cepa *Candida maltosa* MD3-S1 obtuvo un valor de k de $0.0173 \pm 0.0020 \text{ h}^{-1}$ ($r^2=0.9415$). Mientras que, las cepas *Candida maltosa* MD10-A1, *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1 y *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z fueron capaces de degradar TNT, a pesar de los valores bajos de las constantes de velocidad de reacción ($k < 0.0104 \text{ h}^{-1}$). No obstante, los datos de constantes de velocidad de reacción por ajuste del modelo de segundo orden fueron de $0.0001 \pm 0.0 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en todos los ensayos de degradación de TNT por nuestras cepas de levaduras, indicando una baja tasa de degradación cuando el ajuste se realiza con un modelo de segundo orden. Por lo tanto, la tasa de degradación de TNT es más rápida con la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 con el ajuste del modelo de primer orden.

Tabla 6. Modelos cinéticos de degradación de TNT por cinco cepas de levaduras.

Cepa	Primer orden		Segundo orden	
	$k_1 (\text{h}^{-1})$	r^2	$k_2 (\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$	r^2
<i>Debaryomyces hansenii</i> MD10-A3	0.0159 ± 0.001	0.9735	0.0001 ± 0.000	0.9649
<i>Candida maltosa</i> MD3-S1	0.0173 ± 0.002	0.9415	0.0001 ± 0.000	0.9414
<i>Candida maltosa</i> MD10-A1	0.0104 ± 0.002	0.8967	0.0001 ± 0.000	0.8771
<i>Yarrowia lipolytica</i> 9TS-500-1	0.0080 ± 0.001	0.8499	0.0001 ± 0.000	0.8071
<i>Candida orthopsilosis</i> 8TS-500Z	0.0071 ± 0.001	0.8183	0.0001 ± 0.000	0.7996

Los ensayos realizados de biodegradación de TNT por nuestras cepas de levaduras obtuvieron valores menores de constantes de velocidad de reacción al compararlas con

el estudio realizado por Park et al. (2003) con la cepa de *Pseudomonas putida* KP-T202 en la degradación de TNT. Ellos obtuvieron un valor de k , utilizando un modelo cinético de primer orden, de 0.348 h^{-1} a una concentración inicial de 100 mg/L de TNT, durante 15 h de incubación. El alto valor k obtenido se debe a que la cepa bacteriana fue evaluada en condiciones óptimas que influyen positivamente en la biodegradación del TNT. Por otro lado, el reporte de Sheibani et al. (2011a) presenta valores de k de 0.063 , 0.028 , 0.022 y 0.032 h^{-1} mediante el uso de cuatro cepas de bacterianas, *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas sp.* y *Alcaligenes faecalis*, respectivamente, en 48 horas de incubación en medio mínimo de sales con 100 mg/L de TNT. Los valores reportados de constantes de velocidad de reacción fueron altos a diferencia de lo reportado en éste trabajo, debido al suplemento nutricional agregado.

Los ensayos en éste trabajo se realizaron a la concentración de 200 mg/L de TNT, que es el doble del empleado en los estudios cinéticos anteriormente mencionados. Por tanto, las características de biodegradabilidad ampliamente diferentes se deban a una concentración inicial superior. Además, la evaluación de la constante de velocidad de reacción a altas concentraciones de compuestos químicos se explicaría mejor mediante un modelo de cinético de saturación, siendo la constante de saturación la más adecuada; sin embargo, no fue parte del objetivo de nuestro proyecto.

4.3.3. Crecimiento celular de levaduras

Durante la incubación, la correlación entre la disminución de la concentración de TNT y el aumento de la densidad celular en los cultivos se siguió para demostrar que las cepas de levaduras evaluadas utilizan TNT como fuente nutricional, pues era la única fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo sintético. En la Figura 15, se observan los cambios dependientes del tiempo en el crecimiento celular (unidad formadora de colonia (UFC)). El crecimiento celular, con inóculo inicial de $1.5 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$, se inició después de la degradación y alcanzó niveles máximos a las 72 h de incubación. A partir de ese periodo hasta la última toma de muestra, se determinó que el crecimiento celular en todas las cepas de levaduras disminuía

gradualmente. Pero se demostró que la biotransformación procede con las células viables residuales.

Estudios realizados con la cepa de levadura *Yarrowia lipolytica* AN-L15 corroboran nuestros datos, pues muestran un crecimiento máximo a las 72 h de incubación, en presencia de TNT (Ziganshin *et al.*, 2010b); además, indican un que el TNT y sus productos de transformación provocarían un retardo en el crecimiento de la levadura (Ziganshin *et al.*, 2007a).

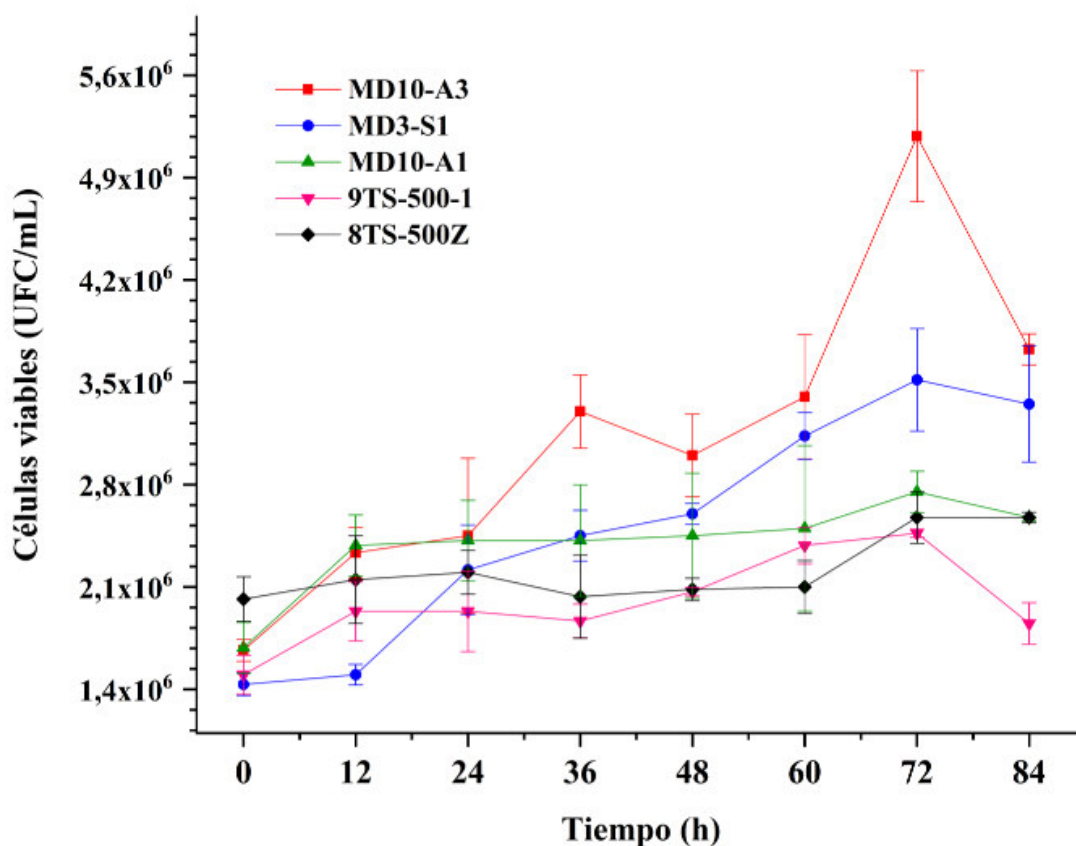


Figura 15. Cambios en el crecimiento celular después del periodo de incubación, en medio de cultivo sintético con 200 mg/L de TNT a pH 6.5, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C por 84 horas.

Las curvas de crecimiento que se obtuvieron muestran dos fases principales de desarrollo; la fase exponencial o fase logarítmica (con máximo rendimiento y alta concentración de proteínas) y la fase estacionaria (los nutrientes del medio se agotan y no hay división celular). Si relacionamos la remoción de TNT (Figura 14) con el crecimiento celular de las levaduras (Figura 15), podemos detectar que la reducción

de TNT se incrementa a medida que aumenta la densidad celular de las cepas de levaduras en la fase logarítmica; lo cual podemos observar claramente en las cepas *Debaryomyces hansenii* MD10-A3, *Candida maltosa* MD3-S1. Sin embargo, el crecimiento celular de las cepas *Candida maltosa* MD10-A1, *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1 y *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z se da paulatinamente, siendo las de menor eficiencia de remoción de TNT obtenidas en el presente estudio. La disminución de crecimiento puede deberse al agotamiento de nutrientes o a una reducción en la población celular en función de la toxicidad de los productos de transformación acumulados, producidos en la vía reducción del grupo nitro. Esta vía de degradación conduce a la acumulación de compuestos altamente tóxicos como el nitroso-, hidroxilamino- y amino- dinitrotoluenos (Castellanos *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018; Ziganshin & Gerlach, 2014). Este comportamiento en el crecimiento celular concuerda con los adquiridos por investigaciones previas sobre la capacidad de biodegradación de TNT por levaduras (Zaripov *et al.*, 2002; Ziganshin & Gerlach, 2014) y bacterias (Khan *et al.*, 2013; Mercimek *et al.*, 2013; Mercimek *et al.*, 2015).

Dado que el crecimiento es el resultado de actividades enzimáticas catabólicas y anabólicas, estos procesos también se pueden describir cuantitativamente sobre la base de modelos de crecimiento. La tasa específica de crecimiento (μ) de una población de microorganismos durante la remoción de un compuesto tóxico recalcitrante podría ser una herramienta valiosa en los procesos de biodegradación. Por todo ello, nosotros determinamos la tasa específica de crecimiento (μ) para todos los tratamientos durante la fase exponencial que correspondió a las 72 h de crecimiento.

En la Tabla 7 se describen los valores para la tasa específica de crecimiento, determinada a través de la densidad celular; tiempo de duplicación y el número de generaciones. Como se observa las cepas de levaduras *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 y *Candida maltosa* MD3-S1, durante su fase exponencial, crecen rápidamente y pueden duplicar su biomasa dentro de las 60 h de incubación. Además, el ajuste del modelo de crecimiento de la cepa *Candida maltosa* MD3-S1 ($r^2 = 0.9414$) fue superior al ajuste de la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 ($r^2 = 0.8724$), lo

que indica que podría existir un efecto de los productos durante la degradación de TNT, sobre el crecimiento celular.

Tabla 7. Evaluación de la tasa de crecimiento específico, tiempo de duplicación y número de generaciones.

Cepa	Tasa específica de crecimiento “ μ ” (h ⁻¹)	r ²	Tiempo de duplicación (h)	Número de Generaciones (h ⁻¹)
MD10-A3	0.0136 ± 0.0025	0.8724	50.9220 ± 2.4750	0.0196 ± 0.0009
MD3-S1	0.0122 ± 0.0011	0.9414	57.0316 ± 5.9916	0.0175 ± 0.0018
MD10-A1	0.0042 ± 0.0014	0.6386	164.3239 ± 6.6811	0.0061 ± 0.0022
9TS-500-1	0.0058 ± 0.0010	0.8632	119.1418 ± 12.2792	0.0084 ± 0.0011
8TS-500Z	0.0021 ± 0.0012	0.3650	334.3795 ± 9.2843	0.0030 ± 0.0001

4.3.4. Determinación de nitrito durante la degradación de TNT

El metabolismo del TNT por microorganismos involucra dos vías reductivas de sistema enzimático: uno responsable de la reducción del grupo aromático, y el otro responsable del ataque nucleofílico de un ión hidruro conduciendo a complejos Meisenheimer, el cual con frecuencia es acompañado por la liberación de nitrito (Liang *et al.*, 2017; Smets *et al.*, 2007; Ziganshin *et al.*, 2007b; Ziganshin *et al.*, 2010b); siendo ésta última vía reductiva considerada la principal en levaduras (Khilyas *et al.*, 2017; Ziganshin & Gerlach, 2014).

Sin embargo, la liberación de un grupo nitro puede ocurrir no solo a través de la vía del hidruro, sino también durante las reacciones entre HADNT y complejos de dihidruro de Meisenheimer en microorganismos capaces de degradar TNT por ambas vías metabólicas (Wittich *et al.*, 2008; Ziganshin & Gerlach, 2014). Por tanto, la determinación de nitrito nos asegura el uso de TNT vía Meisenheimer; más no la posible capacidad de degradar por ambas vía; además, de ser una evidencia positiva de desmineralización y degradación de TNT.

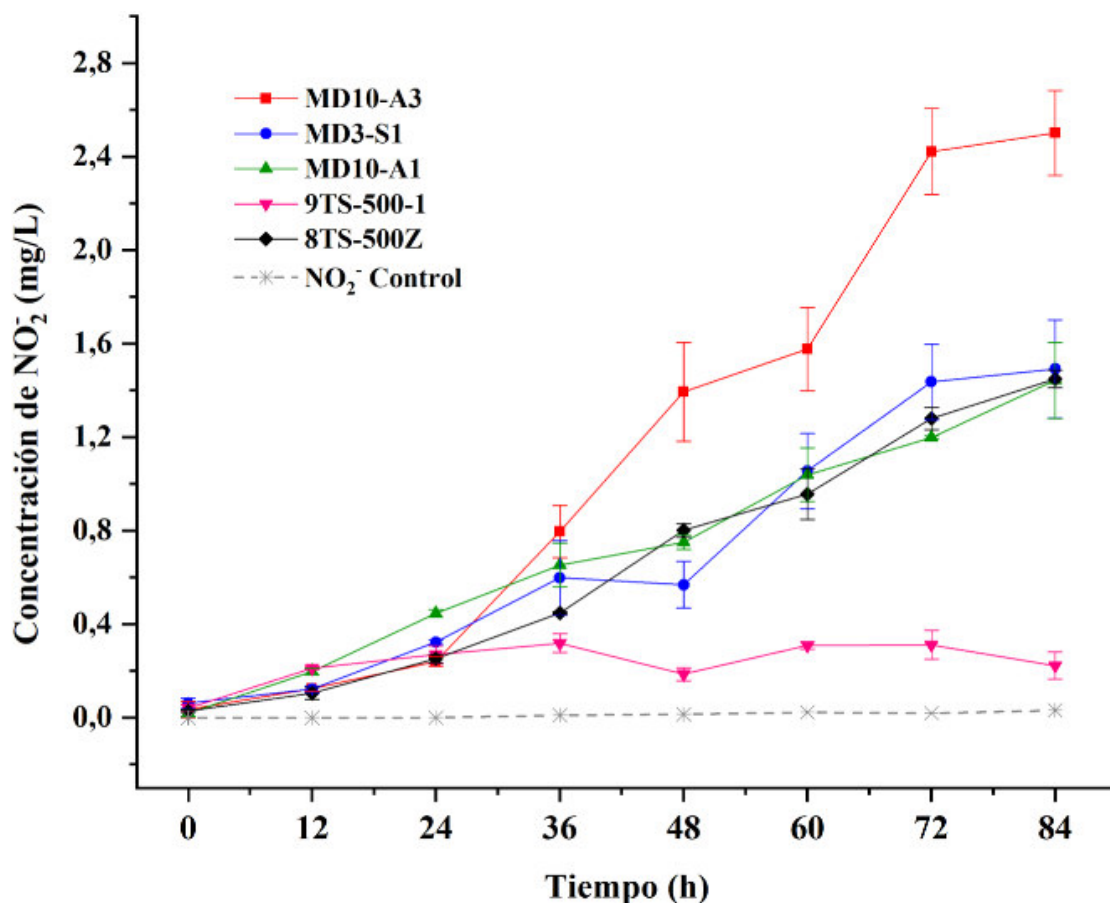


Figura 16. Liberación del ión nitrito (NO_2^-) durante la degradación de TNT por cinco cepas de levaduras. Medio de cultivo sintético con 200 mg/L de TNT a pH 6.5, 120 rpm y $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ por 84 horas.

La liberación de nitrito se muestra en la Figura 16, en la cual se puede observar el aumento de la concentración del ión nitrito con relación al tiempo de incubación. La concentración del ión nitrito crece exponencialmente después de las 24 h de incubación y continuó creciendo hasta la última toma de muestra. Sin embargo, esta tendencia no se da en todas las cepas evaluadas; así mismo, la concentración de nitrito liberada por cada cepa de levadura fue significativamente diferente en la última toma de muestra ($p < 0.05$). La cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 mostró la concentración de nitrito liberada más alta con 2.5 ± 0.18 mg/L a las 84 h de incubación. Mientras que, en los cultivos con las cepas *Candida maltosa* MD3-S1, *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z, *Candida maltosa* MD10-A1 detectamos cantidades de nitrito similares de 1.49 ± 0.21 mg/L, 1.45 ± 0.04 y 1.44 ± 0.16 mg/L durante las 84 h de incubación, respectivamente. La concentración más baja de nitrito se obtuvo con la cepa *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1 con 0.22 ± 0.06 mg/L a las 84 h, tiempo de la última toma de

muestra. Sin embargo, mostró su concentración máxima a las 36 h con 0.32 ± 0.04 mg/L de nitrito. El incremento y descenso de la concentración de nitrito es una tendencia que únicamente fue presentada por la cepa *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1.

Las Figuras 17-21 muestran la interacción de la concentración de TNT, liberación del ión nitrito y densidad celular, durante las 84 h de incubación para cada una de las cepas evaluadas. Es así que al comparar en dichas figuras la tendencia de concentración de nitrito liberado y TNT, podemos observar que el incremento de la concentración de nitrito liberado se correlaciona con la reducción de la concentración de TNT. Estos resultados evidencian que la liberación de nitrito es producto de la utilización del TNT como única fuente de nitrógeno en el crecimiento celular de las cepas de levaduras. La detección de iones de nitrito manifiesta la liberación de nitrógeno desde el anillo aromático durante la biodegradación. Además, la identificación de concentraciones muy bajas de iones de nitrito como producto de transformación en el cultivo control verifica la poca acción de la degradación química o fotodegradación en el TNT. Todo ello indica la participación directa de las cepas de levaduras en la liberación de NO_2^- a partir de TNT.

Además, en las Figuras 17-21 podemos correlacionar la liberación de nitrito y el crecimiento celular, las cuales muestran tendencias crecientes durante las 48 h de incubación. Las gráficas demuestran cierta dependencia de la liberación de nitrito en el crecimiento celular, es así que observamos que la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3, con mayor liberación de nitrito, presenta la mayor densidad celular. En contraste, la cepa *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1, con menor producción de nitrito, presenta la menor tasa de crecimiento. Lo cual, demuestra el empleo fundamental del nitrógeno inorgánico liberado en la integración como nitrógeno orgánico en las células (Serrano-González *et al.*, 2018). Por otro lado, la disminución en la concentración de nitrito por la cepa *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1, podría estar asociada a la formación de nitrato como resultado de la oxidación directa de nitrito por esta levadura. Estudios reportan que la reducción de nitrito, se realiza por dos vías, las cuales se relacionan directamente a los complejos Meisenheimer producidos en la ruta de reducción del

anillo aromático (Jain *et al.*, 2004; Ziganshin & Gerlach, 2014; Ziganshin *et al.*, 2010a).

Aunque los productos intermedios de biotransformación no hayan sido determinados, el incremento en el crecimiento celular, la liberación y acumulación de nitrito en medios de cultivo con TNT como única fuente de nitrógeno indican fuertemente que las cepas de levaduras evaluadas presentan la maquinaria enzimática para degradar TNT, y utilizan el nitrógeno que es liberado en los procesos de biodegradación. Por lo tanto, nosotros demostramos la capacidad de degradación de TNT previamente desconocida de las cepas identificadas *Debaryomyces hansenii* MD10-A3, *Candida maltosa* MD3-S1, *Candida orthopsilosis* 8TS-500Z y *Candida maltosa* MD10-A1, cuando se cultiva en un medio sintético con glucosa en presencia de TNT. Además, de contar con una cepa degradadora de TNT ampliamente reportada *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1. Por lo tanto, nuestros resultados apoyarían la sugerencia de que nuestras levaduras llevan a cabo la degradación de TNT mediante la ruta que conduce a la formación de complejos Meisenheimer, debido a que, la formación del ión nitrito se da preferencialmente por esa vía (Mulla *et al.*, 2014; Ziganshin & Gerlach, 2014). Además, de ser la ruta más atractiva en términos de crear potencial catabólico para la biodegradación efectiva de TNT.

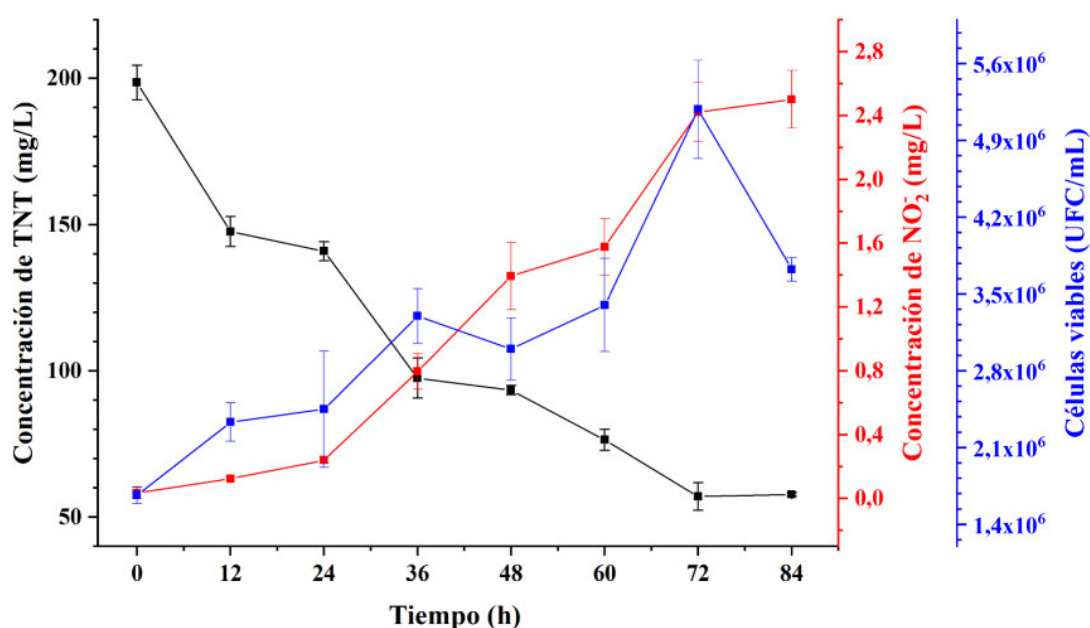


Figura 17. Remoción de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 en medio sintético a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y 25 °C \pm 3 °C. Constantes de velocidad $k_1 = 0.0159 \text{ h}^{-1}$, $k_2 = 0.0001 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y $\mu = 0.0136 \text{ h}^{-1}$.

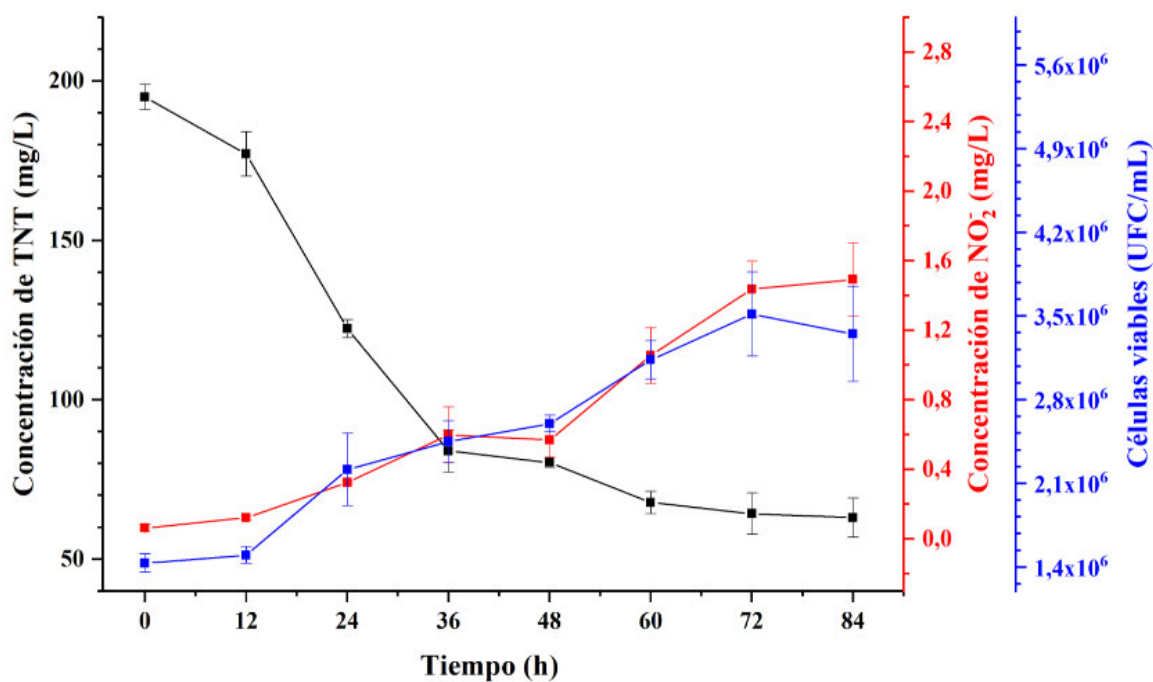


Figura 18. Remoción de TNT por la cepa *Candida maltosa* MD3-S1 en medio sintético a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C. Constantes de velocidad $k_1 = 0.0173 \text{ h}^{-1}$, $k_2 = 0.0001 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y $\mu = 0.0122 \text{ h}^{-1}$.

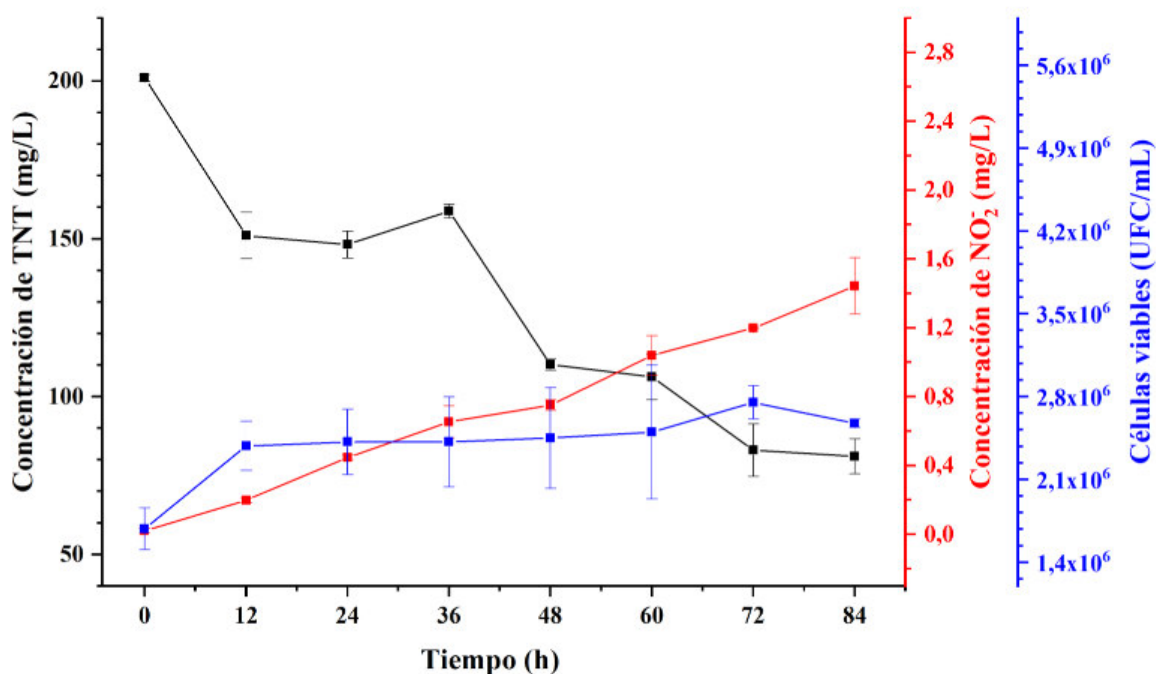


Figura 19. Remoción de TNT por la cepa *Candida maltosa* MD10-A1 en medio sintético a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C. Constantes de velocidad $k_1 = 0.0104 \text{ h}^{-1}$, $k_2 = 0.0001 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y $\mu = 0.0042 \text{ h}^{-1}$.

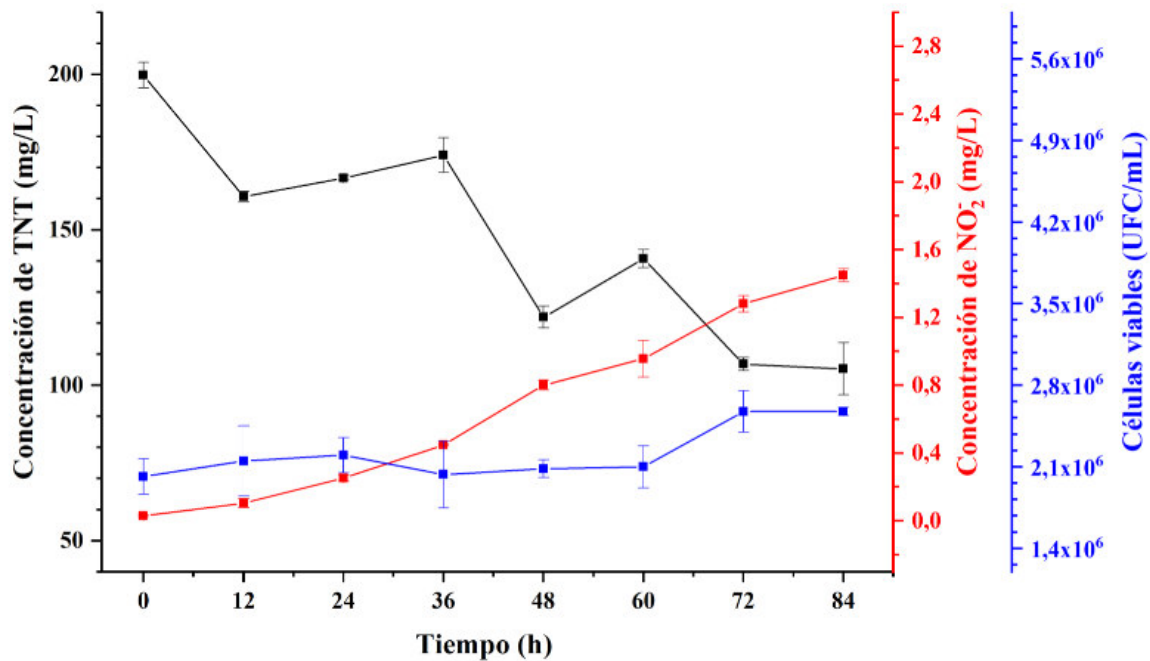


Figura 20. Remoción de TNT por la cepa *Candida orthopsilosis* 8TS-500-1 en medio sintético a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C. Constantes de velocidad $k_1 = 0.0071 \text{ h}^{-1}$, $k_2 = 0.0001 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y $\mu = 0.0021 \text{ h}^{-1}$.

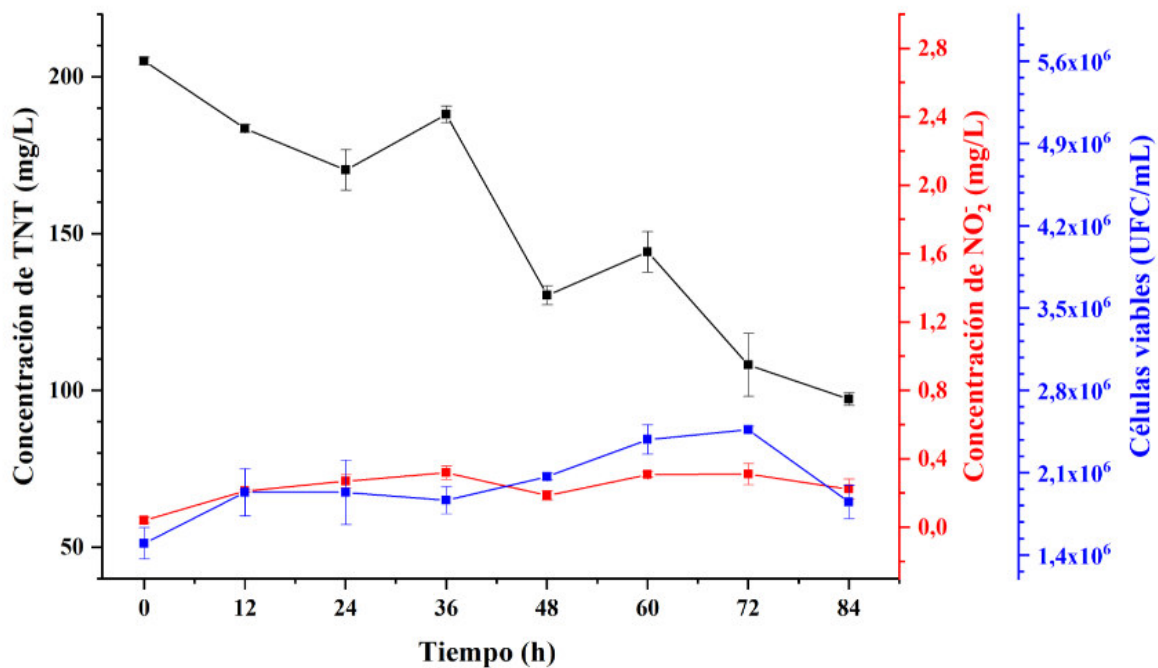


Figura 21. Remoción de TNT por la cepa *Yarrowia lipolytica* 9TS-500-1 (identificada por Medina Canzio (2009)) en medio sintético a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C. Constantes de velocidad $k_1 = 0.0080 \text{ h}^{-1}$, $k_2 = 0.0001 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y $\mu = 0.0058 \text{ h}^{-1}$.

4.4. Efecto de factores en la capacidad degradadora de TNT

La cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 fue hallada como la levadura con mejor capacidad de degradación de TNT entre todas las cepas evaluadas. Por tanto, fue usada para evaluar el efecto de la variación del pH, concentración del inóculo inicial, glucosa, NH_4Cl y tween 80; los cuales fueron seleccionados como los factores que afectarían el rendimiento de la degradación de TNT. El tratamiento del DFF a tres niveles fue realizado por el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV, con el cual se obtuvo el método de diseño factorial fraccionado (DFF, 2^{5-1}) evaluando los cinco factores, en tres niveles [1, 0, -1]. Se obtuvo un total de 19 ensayos, los primeros 16 corresponden a la combinación de los factores en cada nivel; agregando 3 réplicas del punto central para validar la obtención de datos. La respuesta fue el porcentaje de remoción de TNT; además, se evaluó brevemente la respuesta concentración de nitrito (NO_2^-).

La Tabla 8 muestra la matriz de respuesta generada por el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV; en el cual podemos observar los 19 ensayos con su respectiva respuesta. Además, en las Figuras 22, 23 y 24 podemos observar el comportamiento de los 19 ensayos determinados por el DFF monitoreadas en tres tiempos 0, 36 y 72 horas.

En las Figuras 22, 23 y 24, se muestra el cambio de color del medio en todas las unidades experimentales durante el proceso de degradación de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3. Se observa que, al tiempo de 0 h, los ensayos presentan un cambio leve en el color del medio. Lo cual podría indicar la temprana respuesta de la levadura en el ataque al TNT, debido a la variación de factores en el medio de cultivo. Durante las 36 h de incubación podemos observar la coloración de rojo pardo intenso en algunos ensayos; para posteriormente cambiar a naranja amarillo a las 72 h de incubación.

El comportamiento de cambio de color del medio ha sido observado en diferentes estudios, los cuales atribuyen la coloración a los diferentes subproductos liberados

durante la degradación de TNT, como son los complejos hidruro-Meisenheimer (Pannier, 2009; Ziganshin & Gerlach, 2014; Ziganshin *et al.*, 2007b) y los aminodinitrotoluenos (Nyanhongo *et al.*, 2009); como se analizó anteriormente.

Tabla 8. Matriz de respuesta del efecto de los factores en la degradación de TNT.

ENSAYO	FACTORES					RESPUESTA	
	Glucosa (g/L)	NH ₄ Cl (g/L)	Tween 80 (%)	pH	Inóculo (DO)	Remoción de TNT (%)	Concentración de NO ₂ ⁻ (mg/L)
1	2.52	0	0.1	4.5	0.7	37.9	0.005
2	7.56	0	0.1	4.5	0.3	42.3	0.161
3	2.52	0.2	0.1	4.5	0.3	28.7	0.072
4	7.56	0.2	0.1	4.5	0.7	44.9	0.000
5	2.52	0	0.5	4.5	0.3	45.5	0.600
6	7.56	0	0.5	4.5	0.7	32.2	0.032
7	2.52	0.2	0.5	4.5	0.7	30.8	0.254
8	7.56	0.2	0.5	4.5	0.3	54.6	0.298
9	2.52	0	0.1	7.5	0.3	59.1	3.740
10	7.56	0	0.1	7.5	0.7	69.7	6.491
11	2.52	0.2	0.1	7.5	0.7	77.1	6.384
12	7.56	0.2	0.1	7.5	0.3	81.3	5.027
13	2.52	0	0.5	7.5	0.7	68.1	6.464
14	7.56	0	0.5	7.5	0.3	63.,1	4.264
15	2.52	0.2	0.5	7.5	0.3	69.6	6.859
16	7.56	0.2	0.5	7.5	0.7	74.2	4.175
17	5.04	0.1	0.3	6	0.5	56.3	0.090
18	5.04	0.1	0.3	6	0.5	56.7	0.072
19	5.04	0.1	0.3	6	0.5	57.4	0.045

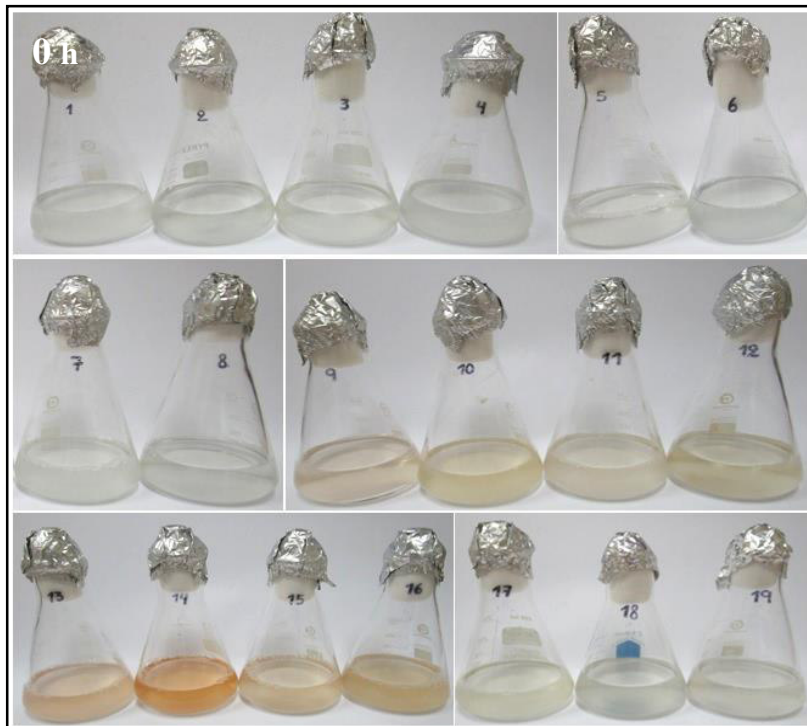


Figura 22. Unidades experimentales establecidas por el método DFF, 2^{5-1} , para cinco factores, en la remoción de TNT a 200 mg/L, 120 rpm y $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 a las 0 h.

d
d

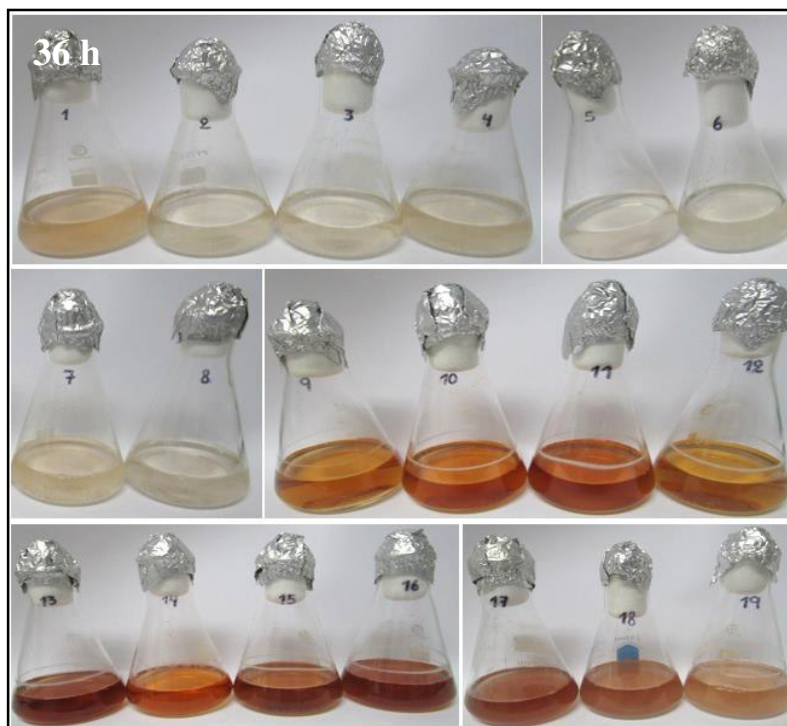


Figura 23. Unidades experimentales establecidas por el método DFF, 2^{5-1} , para cinco factores, en la remoción de TNT a 200 mg/L, 120 rpm y $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 a las 36 h.

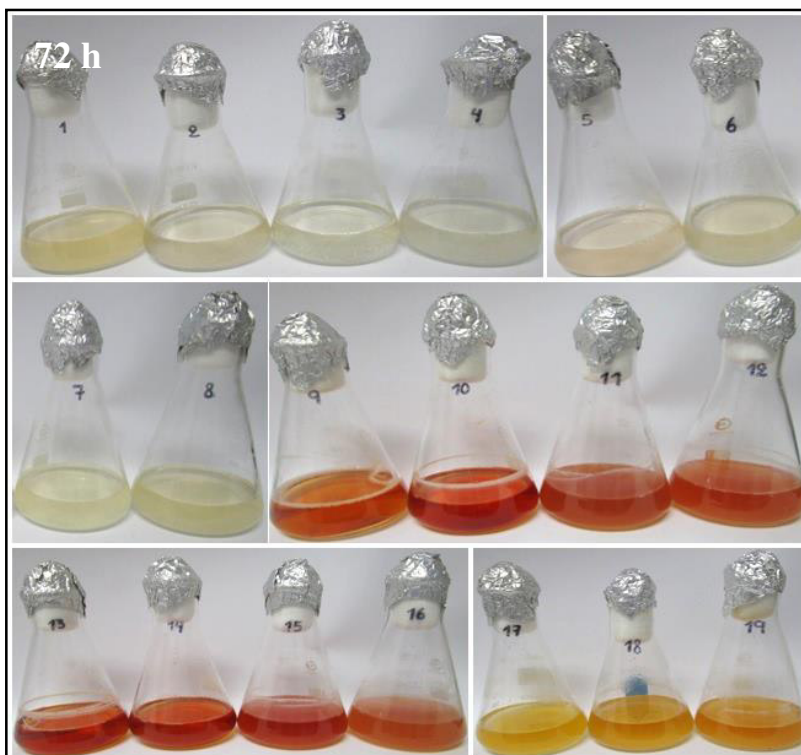


Figura 24. Unidades experimentales establecidas por el DFF, 2^{5-1} , para cinco factores, en la remoción de TNT a 200 mg/L, 120 rpm y $25 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 a las 72 h.

4.4.2. Análisis de varianza (ANOVA)

Los análisis estadísticos se obtuvieron a partir de la matriz de respuesta (Tabla 8), generada por el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV con el método de diseño factorial fraccionado (DFF, 2^{5-1}).

El efecto de cada factor en nuestro sistema de respuesta se muestra en los resultados ANOVA (Tabla 9). Estableciendo un nivel de confianza del 95 % para cada factor, glucosa (A), NH_4Cl (B) y pH (D), con valores- P de 0.0076, 0.0087 y 0.0001, respectivamente; se identifican como factores influyentes en el porcentaje de remoción de TNT. En contraste, los factores tween 80 (C) e inóculo (E) con valor- $P > 0.05$, no representan efectos significativos a la remoción de TNT. Además, al evaluar como respuesta la concentración de nitrito (Tabla 13, anexo), el factor significativo fue únicamente el pH (valor- $P < 0.05$).

Tabla 9. Resultados ANOVA para todos los efectos incorporados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Glucosa	129.391	1	129.391	41.63	0.0076
B:NH₄Cl	117.181	1	117.181	37.70	0.0087
C:Tween 80	0.5256	1	0.5256	0.17	0.7085
D:pH	3760.76	1	3760.76	1209.92	0.0001*
E:Inóculo	5.4056	1	5.4056	1.74	0.2789
AB	169.651	1	169.651	54.58	0.0051
AC	40.0056	1	40.0056	12.87	0.0371
AD	17.4306	1	17.4306	5.61	0.0987
AE	61.2306	1	61.2306	19.70	0.0213
BC	0.4556	1	0.4556	0.15	0.7273
BD	105.576	1	105.576	33.97	0.0101
BE	1.6256	1	1.6256	0.52	0.5219
CD	28.8906	1	28.8906	9.29	0.0555
CE	130.531	1	130.531	41.99	0.0075
DE	106.606	1	106.606	34.30	0.0099
Error total	9.32484	3	3.1083		
Total (corr.)	4684.58	18			

Por otro lado, el diagrama de Pareto (Figura 25) determina si un efecto es estadísticamente significativo en un nivel de significancia del 5%. Los factores que cruzan la línea roja en el gráfico, son considerados como significantes y el color de las barras muestran si el efecto es positivo (negro) o negativo (azul). Por lo tanto, del gráfico podemos verificar lo analizado mediante el ANOVA y que, entre los cinco factores evaluados, el pH es el más significativo en el porcentaje de remoción de TNT. Además, la interacción más efectiva fue observada entre la concentración de glucosa y NH₄Cl (AB).

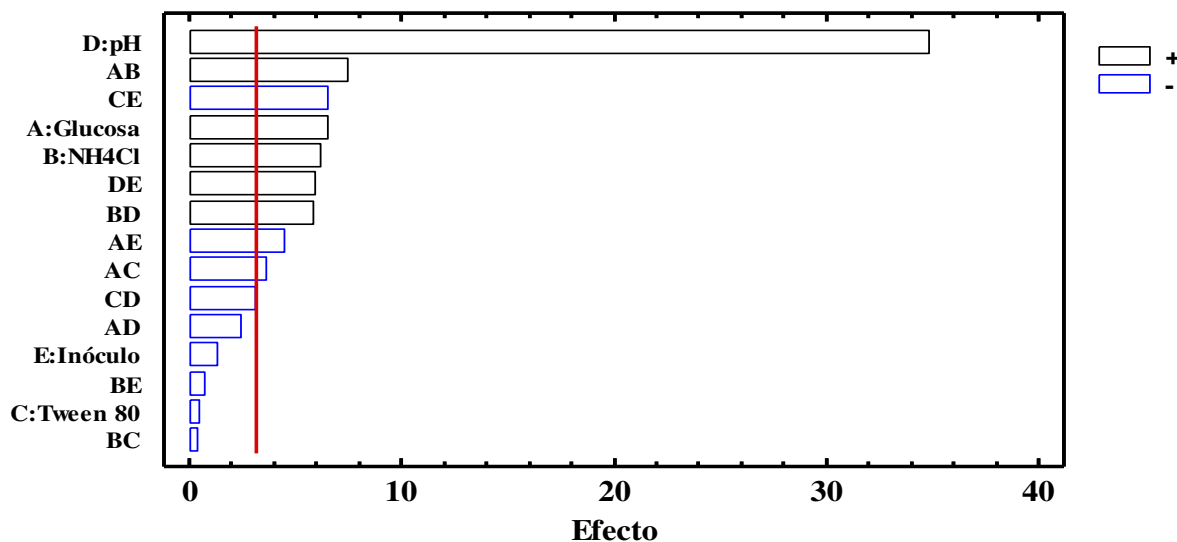


Figura 25. Diagrama de Pareto para el DFF (2^{5-1}) para cinco factores: glucosa, NH_4Cl , tween 80, pH e inóculo, afectando la remoción de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3. Obtenido por el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV, método DFF, 2^{5-1} .

4.4.3. Efectos de factores en la degradación de TNT

La evaluación de los efectos de los factores, glucosa, NH_4Cl , tween 80, pH y concentración inicial de inóculo, se obtuvo a partir de la matriz de respuesta (Tabla 8) generada por el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV, con el método de diseño factorial fraccionado (DFF, 2^{5-1}).

a. Factores principales individuales

La tendencia, desde un nivel bajo a alto, de los efectos individuales de los cinco factores en el porcentaje de eficiencia de remoción de TNT se observa en la Figura 26. El incremento de los factores glucosa, NH_4Cl y pH presentan un efecto positivo, pues se observa un aumento en el porcentaje de remoción de TNT a medida que los factores van de niveles bajos a niveles altos. Sin embargo, las tasas de crecimiento son diferentes, siendo el factor pH el de mayor tasa de incremento. Las tasas lentas en el incremento de remoción de TNT por los factores glucosa y NH_4Cl puede explicarse por el hecho de que los niveles más bajo de NH_4Cl y glucosa, en esta investigación, podría apoyar suficientemente la remoción de TNT, para ser finalmente usado como

fuerza de energía. Es así que el agregar una mayor concentración de ambos factores, en niveles altos, resultaría redundante.

Algunos estudios reportan a las fuentes de carbono y nitrógeno como esenciales para el metabolismo de TNT ya que los cultivos deficientes de estas dos fuentes no podrían crecer (Jain *et al.*, 2004; Sheibani *et al.*, 2011b). Además, el NH_4Cl es considerado una fuente inicial de nitrógeno adecuada en una fase acuosa para la remoción de TNT (Sheibani *et al.*, 2011b) y la glucosa un equivalente reductor para la transformación de TNT a 2,4-DNT en el medio (Jain *et al.*, 2004).

A pesar del hecho de que, las levaduras presentan buen desarrollo bajo condiciones ácidas, nuestros resultados muestran lo contrario. En medios ácidos la eficiencia de remoción de TNT es baja, en contraste con los medios básicos. Este gran efecto se debe a la capacidad de las levaduras en modular el pH del medio durante su crecimiento, generando cambios en la concentración de protones que probablemente influyan en la transformación de TNT y sus metabolitos (Ziganshin & Gerlach, 2014; Ziganshin *et al.*, 2010b); debido a la inhibición de enzimas responsables de su transformación (Ziganshin *et al.*, 2010b). El decaimiento del pH es producido por la liberación de ácidos orgánicos durante la degradación de TNT (Ziganshin & Gerlach, 2014; Ziganshin *et al.*, 2010a; Ziganshin *et al.*, 2010b). Ziganshin *et al.* (2010b) demuestran la dependencia del pH por 3-H-TNT, pues medios a pH por debajo de 5 inducirían la conversión de 3-H-TNT a TNT por desproporción redox; y en medios básicos existiría mayor estabilidad de este compuesto.

Así mismo, los productos de degradación de TNT como 2,4-DNT, NO_3^- y de complejos Meisenheimer protonados, se acumularían sólo en el proceso de disminución de pH del medio con la simultánea desaparición de 3-H-TNT y NO_2^- (Khilyas *et al.*, 2017; Ziganshin *et al.*, 2007b; Ziganshin *et al.*, 2010b), siendo el producto 2,4-DNT importante por su fácil destrucción por fisión del anillo aromático debido a una mayor susceptibilidad al ataque oxidativo del anillo a comparación del TNT (Ziganshin & Gerlach, 2014).

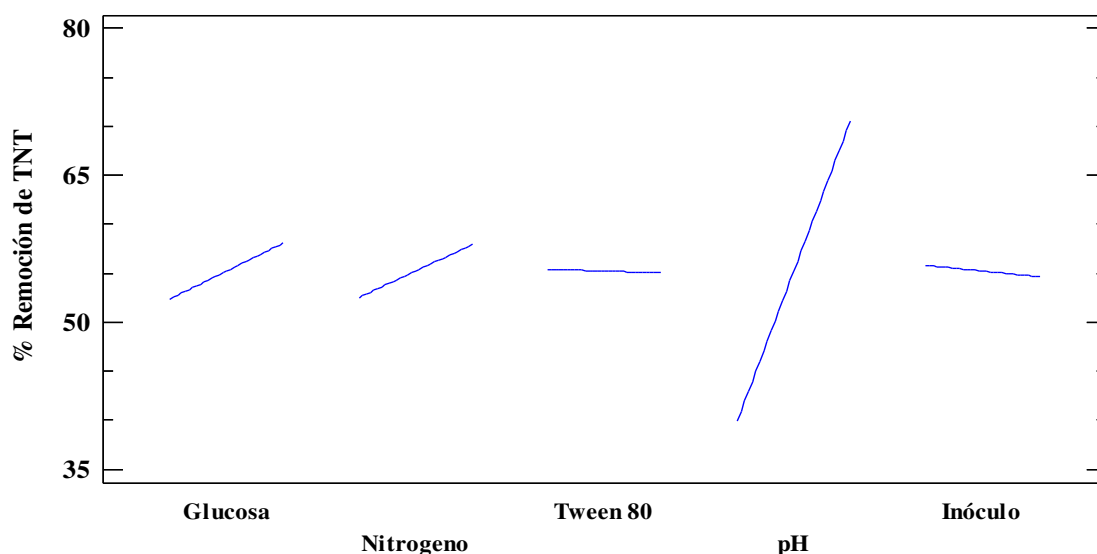


Figura 26. Efectos principales en el porcentaje de eficiencia de remoción de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3. Obtenido por el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV, método DFF, 2^{5-1} .

Los factores tween 80 e inóculo nos muestran un efecto negativo, pues genera un decaimiento en el porcentaje de eficiencia de remoción de TNT a medida incrementa la concentración de tween 80 y densidad celular inicial. Sin embargo, el decaimiento se da a tasas mínimas de aproximadamente 1%, consideradas despreciables. El tween 80 es considerado de gran estímulo para la degradación de TNT (Sheibani *et al.*, 2011b), debido a su efecto en la modificación de la permeabilidad de la membrana plasmática, así como en la tasa de producción y transporte de las enzimas asociadas a la membrana (Avila-Arias *et al.*, 2017; Sheibani *et al.*, 2011a; Sheibani *et al.*, 2011b); y. mejorar la dispersión de TNT en solución acuosa permitiendo la biotransformación (Avila-Arias *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2017). Sin embargo, concentraciones altas podrían generar efectos tóxicos inhibiendo la función microbiana y subsecuente liberación de enzimas (Sheibani *et al.*, 2011a).

Por otro lado, al evaluar los efectos significativos sobre la respuesta concentración de nitrito (Figura 31, anexo); nos llama la atención de que la glucosa presenta un efecto negativo, pues a medida incrementamos su concentración la liberación de nitrito disminuye. Este comportamiento podría ser debido a que a concentraciones bajas de glucosa, los derivados aminos son los principales productos formados; sin embargo, a

concentraciones más altas, se potenciaría la formación de 2,4-DNT (Jain *et al.*, 2004). El cual es producido por la descomposición del 3-H-TNT y reducción del ión NO_2^- (Ziganshin & Gerlach, 2014; Ziganshin *et al.*, 2010a).

b. Interacción de efectos de factores

La interacción de efectos de los factores nos permite ver la existencia de dependencia frente a otro factor, lo cual sería un comportamiento próximo a la realidad. Las interacciones que presentan efectos significativos en la remoción de TNT son Glucosa- NH_4Cl (AB), Glucosa-tween (AC), Glucosa-inóculo (AE), NH_4Cl -pH (BD), tween-inóculo (CE) y pH-inóculo (DE), debido a que presentan un valor- $P < 0.05$. Todas las demás interacciones son insignificantes; por lo tanto, no influyen en el porcentaje de remoción de TNT.

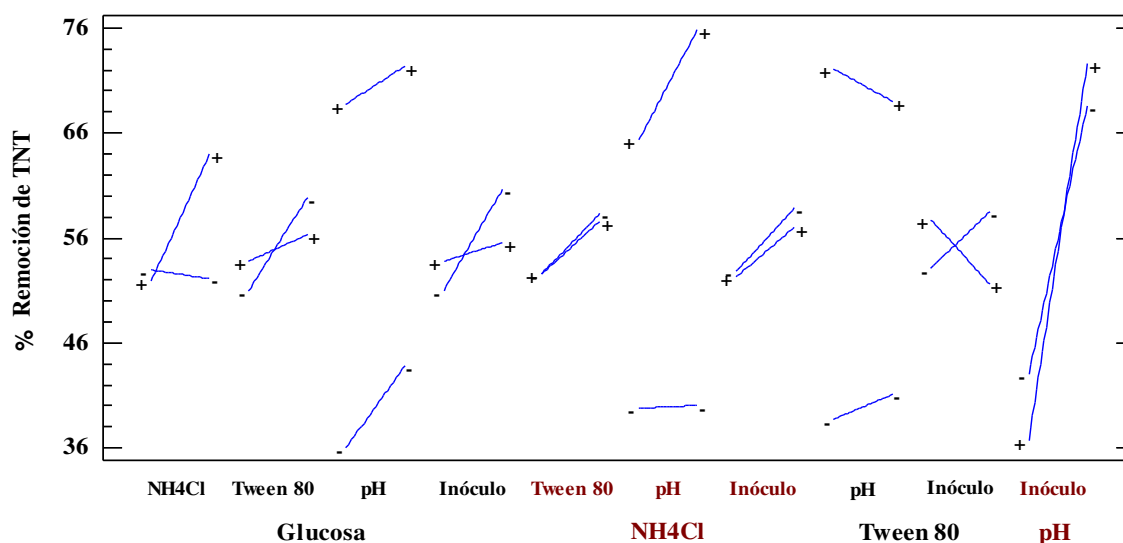


Figura 27. Efecto de la interacción de factores en el porcentaje de eficiencia de remoción de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3. (- nivel menor y + nivel mayor). Obtenido por el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV, método DFF, 2^{5-1} .

El efecto de las interacciones las podemos observar gráficamente en la Figura 27, en la cual las interacciones de factores con líneas de efecto no paralelas, influyen altamente la eficiencia de remoción de TNT, lo cual concuerda con los resultados ANOVA. Las interacciones glucosa- NH_4Cl (AB), glucosa-Tween (AC), glucosa-inóculo (AE), Tween-inóculo (CE) y pH-inóculo (DE) presentan una tendencia

similar, mostrando líneas de nivel menor y mayor cruzadas. Este punto de cruce es un punto de equilibrio donde la interacción de los dos niveles encontraría la máxima eficiencia, para el factor principal evaluado, en la remoción de TNT. Por otro lado, la interacción NH_4Cl -pH (BD) afecta altamente la eficiencia de remoción de TNT. Observamos que a medida que aumentamos la concentración de NH_4Cl , la remoción de TNT aumenta a una gran tasa de crecimiento en el nivel alto de pH (7.5); sin embargo, la eficiencia cae a un nivel bajo de pH (4.2), a pesar que la eficiencia se encuentre en una tendencia creciente leve.

c. Ajuste del Modelo

Al realizar el análisis de regresión encontramos que el porcentaje de remoción en experimentos de optimización puede ser expresado en función de las cinco variables por medio de un modelo polinómico de primer grado:

$$\begin{aligned} \% \text{ Remoción de TNT} = & -12,8553 + 4,375A - 130,312B + 78,3281C + 6,94167D - \\ & 11,9531E + 12,9216AB - 3,1374AC - 0,276124AD - 3,88145AE - 8,4375BC + \\ & 17,125BD - 15,9375BE - 4,47917CD - 71,4062CE + 8,60417DE \end{aligned}$$

Donde A es concentración de glucosa, B es concentración de NH_4Cl , C es % de Tween 80, D es pH y E es concentración inicial de inóculo.

La evaluación del ajuste del modelo se realizó utilizando el coeficiente de correlación R^2 , mientras su valor se aproxime a la unidad el modelo predice mejor la respuesta. El valor R^2 obtenido fue de 0.998, lo cual demuestra una excelente correlación entre los resultados previstos y los experimentales. En otras palabras, el 99.8 % de la variabilidad en el porcentaje de remoción de TNT es atribuible a los factores variables y solo el 0.2 % de la variabilidad total no puede ser explicado por este modelo. Además, el valor de R^2 ajustada, el cual es el más adecuado para comparar modelos con diferente número de variable independientes fue del 0.988. Sin embargo, sería necesario incrementar los niveles de los factores, así como incluir factores como, concentración inicial de TNT, la adición de extracto de levadura, agitación (rpm) y

utilizar otras fuentes de carbono, que posiblemente mejorarían la remoción de TNT. Por otro lado, se determinó las condiciones de reacción probablemente óptimas para el porcentaje de remoción de TNT mediante los cinco factores modificados, los cuales son presentados en la Tabla 10.

Para verificar la validación de las predicciones del modelo, se realizó un conjunto de experimentos a nivel de los factores óptimos, y se compararon el porcentaje de remoción de TNT y la concentración de liberación de nitrito. No obstante, se decidió trabajar con un inóculo inicial de 0.5 DO, pues éste factor no tuvo una influencia significativa en el sistema. Los experimentos de ejecución de validación se llevaron a cabo en matraces de 250 ml que contenían de 100 ml del medio optimizado y 200 mg/L de TNT. Las muestras se retiraron a intervalos apropiados y se analizaron.

Tabla 10. Valores óptimos en cinco factores

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Glucosa	2.52	7.56	7.53
NH₄Cl	0.0	0.2	0.2
Tween 80	0.1	0.5	0.1
pH	4.5	7.5	7.5
Inóculo	0.3	0.7	0.7

*Obtenido por el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV, método DFF, 2⁵⁻¹.

4.5. Degradación de TNT por la cepa MD10-A3 en condiciones óptimas

En la Figura 28, podremos observar el continuo seguimiento de la concentración de TNT, densidad celular y liberación del ión nitrito durante las 72 h de incubación en medio óptimo, por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3. El incremento de la densidad celular y concentración de nitritos, en los cultivos, inicia a medida disminuye la concentración de TNT, indicando su empleo como fuente nutricional. La degradación de TNT a las 24 horas fue del 69.8 %, para continuar descendiendo a las 48 h en 80.6 % de remoción de TNT, manteniendo constante este porcentaje hasta la última toma de muestra. Durante el crecimiento microbiano se observó sólo la fase de desarrollo exponencial, lo cual puede deberse a una fuente

inicial de carbono y nitrógeno más fácilmente metabolizable, en el medio óptimo, para luego proceder a metabolizar el TNT como fuente de energía. Por otro lado, la concentración máxima de nitrito fue de 4.1913 mg/L a las 72 horas. El continuo incremento de la concentración de nitrito indica la presencia de la maquinaria enzimática para metabolizar el TNT.

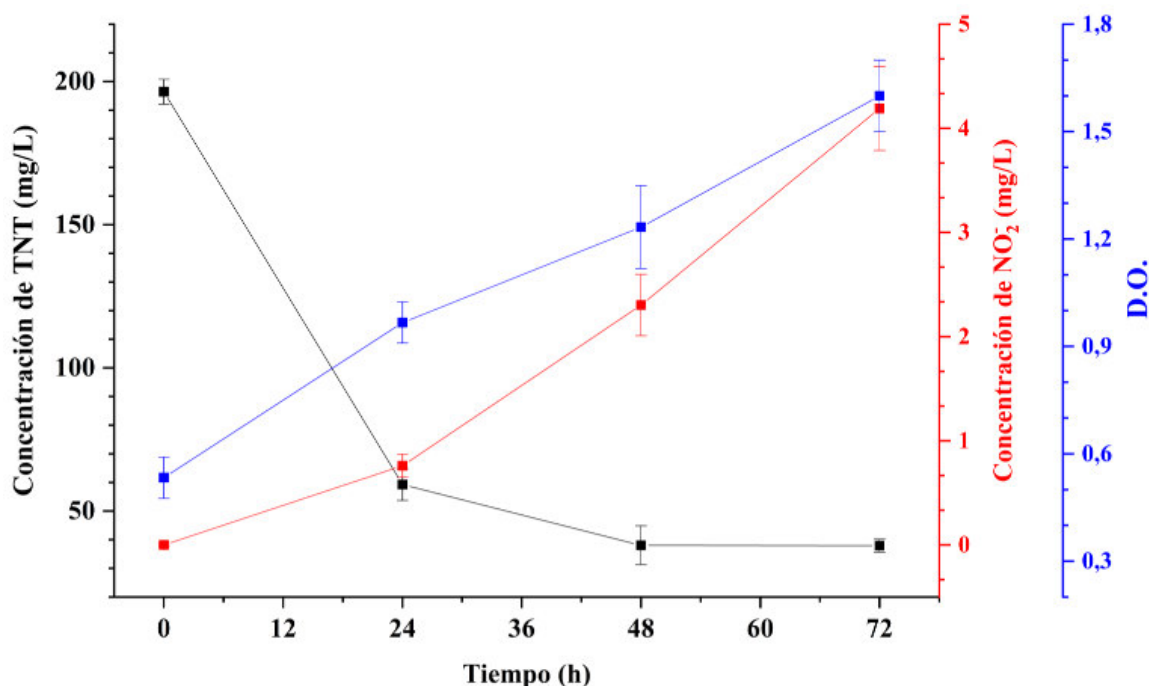


Figura 28. Remoción de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 en medio óptimo a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y 25 °C ± 3 °C. Detección de concentración de TNT y NO₂⁻ por espectrofotometría. Crecimiento celular determinado por la medida de densidad óptica DO.

Al comparar la degradación de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 en medio óptimo y medio sin optimizar (Figura 29), podemos observar una mejora efectiva en la remoción del TNT; el incremento en la densidad celular y concentración de nitrito. Ello nos indica que la acción de variación en concentraciones y adición de nutrientes condujo a una mejora en los procesos de biodegradación. El aumento del porcentaje de remoción de TNT fue del 140 % a las 24 horas, del 52 % a las 48 horas y del 15 % a las 72 horas. Además, el incremento en la concentración de nitrito fue del 75 % a las 72 horas.

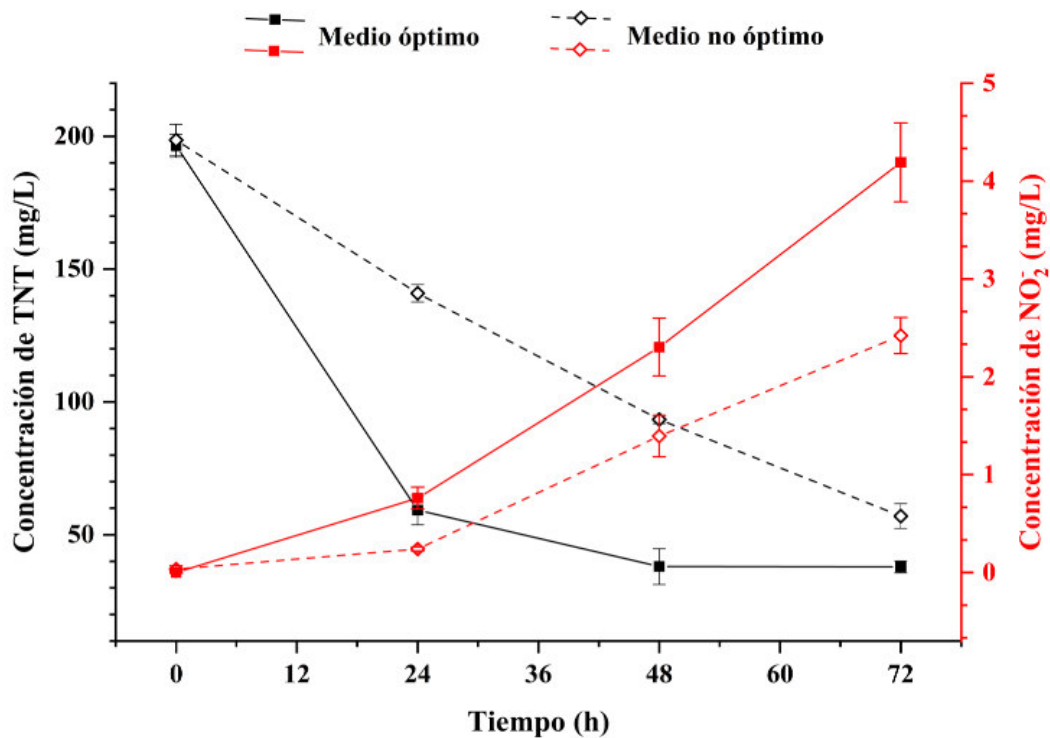


Figura 29. Remoción de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 en medio óptimo (línea continua) y medio no óptimo (línea punteada), a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y 25 °C \pm 3 °C. Detección de concentración de TNT y NO₂⁻ por espectrofotometría.

Además, se comparó el ajuste y los parámetros de los modelos cinéticos de primer y segundo orden en ambos medios (óptimo y sin optimizar) (Tabla 11). Los coeficientes de correlación (r^2), en los dos medios, muestran valores muy próximos a la unidad en ambos modelos cinéticos; es decir que los valores teóricos, predecibles con los modelos cinéticos propuestos, son cercanos a los obtenidos experimentalmente. Lo cual, se confirma en la Figura 30, donde se encuentran representados por medio de líneas continuas y discontinuas los valores teóricos obtenidos a partir de la expresión del modelo, y por medio de círculos y cuadrados los valores experimentales para los diferentes test.

Así mismo, las constantes de velocidad de reacción (k) para la degradación de TNT, son mayores al determinarlos con el modelo cinético de primer orden en ambos medios. Sin embargo, la constante incrementó 132.5 % al emplear el medio mejorado en la degradación de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3.

Por lo tanto, la tasa de degradación fue más rápida en el medio optimizado con tween 80, NH₄Cl y glucosa a un pH de 7.5; y siendo los valores obtenidos de coeficiente de correlación con próxima cercanía a la unidad, se confirmaría que el modelo de primer orden podría representar la cinética de biodegradación de TNT adecuadamente

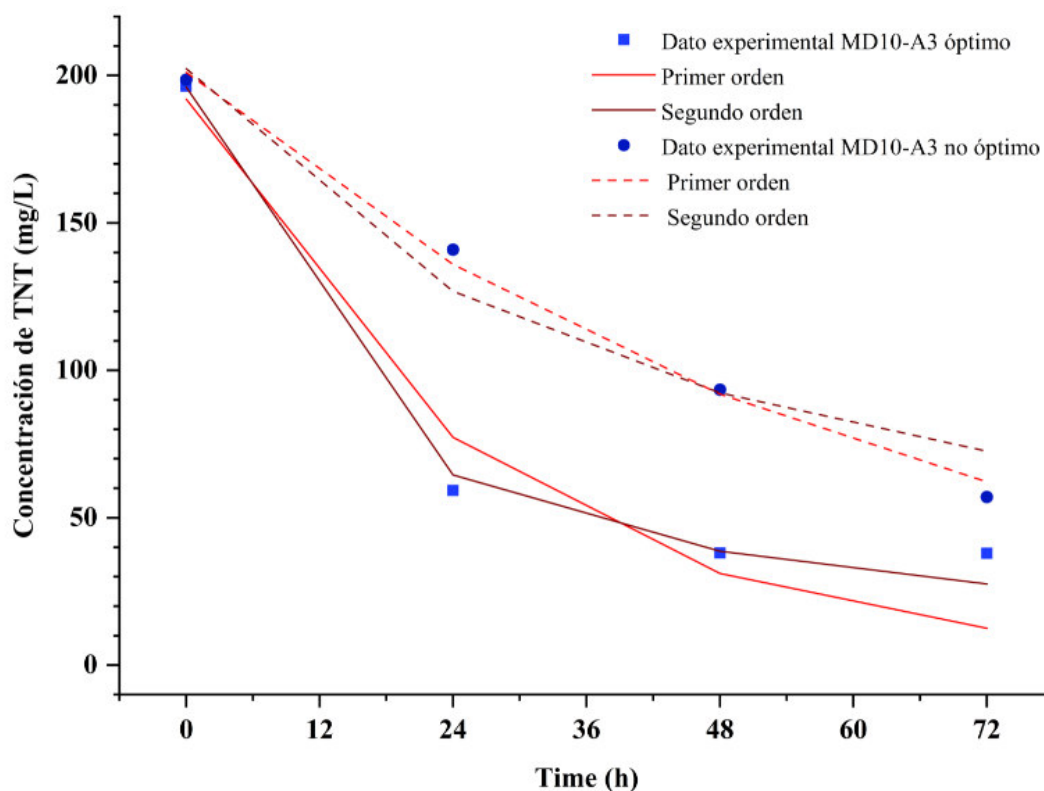


Figura 30. Ajuste de modelos cinéticos en la remoción de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 en medio óptimo (cuadrado) y medio no óptimo (círculo), a 200 mg/L de TNT, 120 rpm y 25 °C \pm 3 °C. Detección de concentración de TNT y NO₂⁻ por espectrofotometría.

Tabla 11. Parámetros constantes de modelos cinéticos para la remoción de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3.

Medio	Remoción de TNT (%)	Primer orden		Segundo orden	
		k_1	r^2	k_2	r^2
Óptimo	80.7 \pm 0.8	0.0379 \pm 0.0097	0.9497	0.0004 \pm 0.0001	0.9926
No óptimo	69.9 \pm 1.2	0.0163 \pm 0.0010	0.9946	0.0001 \pm 0.0000	0.9555

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. De 29 cepas sólo cinco mostraron gran tolerancia frente a la exposición de TNT sin manifestar efecto en el crecimiento, manteniendo su densidad celular a medida aumentaba las concentraciones de TNT. Además, respondieron al tóxico TNT, como el cambio en el patrón morfológico (levadura, pseudomicelio y micelio).
2. Se logró identificar molecularmente 4 cepas de levaduras, mediante el análisis bioinformático de la región D1/D2 del gen LSU 28S rDNA obteniendo especies con 99 % de identidad: la cepa 8TS-500Z pertenece a la especie *Candida orthopsilosis*, MD3-S1 a *Candida maltosa*, MD10-A1 a *Candida maltosa* y MD10-A3 a *Debaryomyces hansenii*.
3. Las cepas de levaduras, en este estudio, fueron capaces de transformar el TNT y emplearlo como su única fuente de nitrógeno tras la liberación de iones nitrito, a partir de medio sintético a 200 mg/L de TNT. La cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 fue la de mayor tasa de degradación de TNT debido a una mayor constante de velocidad de reacción $k_1 = 0.0159 \pm 0.0012 \text{ h}^{-1}$ ($r^2=0.9735$) y crecimiento $\mu = 0.0136 \pm 0.0025 \text{ h}^{-1}$ ($r^2=0.8724$); además de presentar la concentración más alta de nitrito de $2.5 \pm 0.18 \text{ mg/L}$ a las 84 h de incubación.
4. Se estableció un diseño estadístico DFF, 2^{5-1} , el cual nos permitió explicar el comportamiento de la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3 a través de la remoción de TNT en relación a la influencia de factores en el medio de cultivo. Identificamos como los factores más influyentes a la glucosa (A), NH_4Cl (B) y pH (D) con valores- $P < 0.05$. Además, se encontró que el efecto de estos factores en la remoción de TNT puede expresarse adecuadamente mediante un modelo polinómico de primer orden ($r^2=0.998$).

5. La validación de las predicciones del modelo para la degradación efectiva de TNT por la cepa *Debaryomyces hansenii* MD10-A3, fue lograda por la alteración de los factores, glucosa, NH_4Cl , tween 80, pH e inóculo. Obteniendo un aumento en el porcentaje de remoción de TNT del 140 % a las 24 horas. Además, de incrementar su constante de velocidad de remoción en un 132.5 % ($k_1 = 0.0379$), al emplear el medio mejorado.
6. Las nuevas cepas reportadas en este estudio son capaces de degradar TNT liberando nitrito. En consecuencia, nuestro estudio podría contribuir, en la remediación de un amplio rango de compuestos tóxicos nitroaromáticos presentes en productos farmacéuticos, agrícolas e industriales que contaminan persistentemente el ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Avila-Arias, H., Avellaneda, H., Garzón, V., Rodríguez, G., Arbeli, Z., Garcia-Bonilla, E., Roldan, F. (2017). Screening for biosurfactant production by 2,4,6-trinitrotoluene-transforming bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2), 401-413.
- Barbedo, L. S., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Muniz, M. d. M., and Zancopé-Oliveira, R. M. (2017). Comparison of four molecular approaches to identify *Candida parapsilosis* complex species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 214-219.
- Borch, T., Inskeep, W., Harwood, J., and Gerlach, R. (2005). Impact of ferrihydrite and anthraquinone-2,6-disulfonate on the reductive transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by a gram-positive fermenting bacterium. *Environmental Science and Technology*, 39, 7126-7133.
- Castellanos, J., Rios-Velazquez, C., Morales, F., Miranda-Berrocales, V., Lique-Gonzalez, J., Cortez, I., Hernández-Rivera, S. P. (2016). Cyclic voltammetry as a screening tool for the fungal degradation of 2,4,6-trinitrotoluene in aqueous media. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 96(10), 978-989.
- Claus, H. (2014). Microbial Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene In Vitro and in Natural Environments. In S. N. Singh (Ed.), *Biological Remediation of Explosive Residues* (pp. 15-38). Cham: Springer International Publishing.
- Chatterjee, S., Deb, U., Datta, S., Walther, C., and Gupta, D. K. (2017). Common explosives (TNT, RDX, HMX) and their fate in the environment: Emphasizing bioremediation. *Chemosphere*, 184, 438-451.
- Dumont, F., Marechal, P. A., and Gervais, P. (2006). Involvement of Two Specific Causes of Cell Mortality in Freeze-Thaw Cycles with Freezing to -196 C. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1330-1335.

- Esteve-Núñez, A., Caballero, A., and Ramos, J. L. (2001). Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(3), 335-352.
- Felt, D. R., Larson, S. L., and Valente, E. J. (2002). UV–VIS spectroscopy of 2,4,6-trinitrotoluene-hydroxide reaction. *Chemosphere*, 49(3), 287-295.
- Gallagher, E. M. (2010). Anaerobic Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT): Molecular Analysis of Active Degraders and Metabolic Pathways. (Doctor of Philosophy), The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey.
- Gasch, A. P. (2007). Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast*, 24(11), 961-976.
- Gupthar, A. S., Bhattacharya, S., and Basu, T. K. (2000). Evaluation of the maximum specific growth rate of a yeast indicating non-linear growth trends in batch culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(7), 613-616.
- Jain, M. R., Zinjarde, S. S., Deobagkar, D. D., and Deobagkar, D. N. (2004). 2,4,6-Trinitrotoluene transformation by a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Marine Pollution Bulletin*, 49(9), 783-788.
- Jamali, S., Gharaei, M., and Abbasi, S. (2016). Identification of yeast species from uncultivated soils by sequence analysis of the hypervariable D1/D2 domain of LSU-rDNA gene in Kermanshah province, Iran. *Mycologia Iranica*, 3(2), 87-98.
- Jenkins, T. F. (1990). Development of a Simplified Field Method for the Determination of TNT in Soil. *U.S. Army Cold Regions Research and Engineering Laboratory*. 90-38, Hanover, New Hampshire
- Juhasz, A. L., and Naidu, R. (2007). Explosives: Fate, Dynamics, and Ecological Impact in Terrestrial and Marine Environments *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 163-215). New York, NY: Springer New York.
- Kalderis, D., Juhasz, A. L., Boopathy, R., and Comfort, S. (2011). Soils contaminated with explosives: Environmental fate and evaluation of state-of-the-art remediation processes (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 83(7), 1407-1484.
- Karami, M. A., Kamarehie, B., Ghaderpoori, M., Jafari, A., Akrami, A., and Baghban shahri, F. (2017). Improved removal of Trinitrotoluene (TNT) from contaminated

- soil by inducing aerobic process: kinetic and chemical byproducts. *Journal of Advances in Environmental Health Research*, 5(3), 139-145.
- Khan, M. I., Lee, J., and Park, J. (2013). A toxicological review on potential microbial degradation intermediates of 2,4,6-trinitrotoluene, and its implications in bioremediation. *KSCE Journal of Civil Engineering*, 17(6), 1223-1231.
- Khilyas, I. V., Lochnit, G., and Ilinskaya, O. N. (2017). Proteomic Analysis of 2,4,6-Trinitrotoluene Degrading Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2600.
- Kurtzman, C. P. (2006). Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. *Mycoscience*, 47(2), 65-71.
- Kurtzman, C. P., and Fell, J. W. (2006). Yeast Systematics and Phylogeny — Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. In G. Péter & C. Rosa (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 11-30). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., . . . Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Liang, S.-H., Hsu, D.-W., Lin, C.-Y., Kao, C.-M., Huang, D.-J., Chien, C.-C., . . . Chen, C.-C. (2017). Enhancement of microbial 2,4,6-trinitrotoluene transformation with increased toxicity by exogenous nutrient amendment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 138, 39-46.
- Litake, G., Joshi, S., and Ghole, V. (2005). TNT biotransformation potential of the clinical isolate of *Salmonella typhimurium* - potential ecological implications. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 9(1), 29-34.
- Luning, D. J., Breuer, J. E. T., Rios, E. A., Jedlicka, E. E., and O'Sullivan, D. W. (2017). Photolysis of 2,4,6-trinitrotoluene in seawater and estuary water: Impact of pH, temperature, salinity, and dissolved organic matter. *Marine Pollution Bulletin*, 114(2), 977-986.
- Martinez-Vazquez, A., Gonzalez-Hernandez, A., Domínguez, Á., Rachubinski, R., Riquelme, M., Cuellar-Mata, P., and Guzman, J. C. T. (2013). Identification of the Transcription Factor Znc1p, which Regulates the Yeast-to-Hypha Transition in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*. *PLoS ONE*, 8(6), e66790.

- Medina Canzio, S. M. (2009). Caracterización molecular de hongos degradadores de tiocianato aislados de ambientes mineros y evaluación de su capacidad degradativa. *Tesis de grado. Laboratorio de Microbiología Molecular, FCB-UNMSM*.
- Mercimek, H., Dincer, S., Guzeldag, G., Ozsavli, A., and Matyar, F. (2013). Aerobic Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by *Bacillus cereus* Isolated from Contaminated Soil. *Microbial Ecology*, 66(3), 512-521.
- Mercimek, H., Dincer, S., Guzeldag, G., Ozsavli, A., Matyar, F., Arkut, A., . . . Ozdenefe, M. S. (2015). Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *P. aeruginosa* and characterization of some metabolites. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (1), 103-111.
- Mulla, S. I., Talwar, M. P., and Ninnekar, H. Z. (2014). Bioremediation of 2,4,6-Trinitrotoluene Explosive Residues. In S. N. Singh (Ed.), *Biological Remediation of Explosive Residues* (pp. 201-233). Cham: Springer International Publishing.
- Nyanhongo, G. S., Aichernig, N., Ortner, M., Steiner, W., and Guebitz, G. M. (2009). Incorporation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1), 285-290.
- Orbegozo, J., Abanto, M., García, R., and Ramírez, P. (2008). Identificación molecular de *Pichia guilliermondii* aislada de aguas ácidas de minas en el Perú y su resistencia a metales pesados. *Rev peru. biol.*, 15(1), 91-96.
- Palande, A. S., Kulkarni, S. V., León-Ramirez, C., Campos-Góngora, E., Ruiz-Herrera, J., and Deshpande, M. V. (2014). Dimorphism and hydrocarbon metabolism in *Yarrowia lipolytica* var. indica. *Archives of Microbiology*, 196(8), 545-556.
- Pannier, A. J. (2009). Reductive transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Yarrowia lipolytica* AN-L15 under conditions of different initial pH of the culture medium or in the presence of ferrihydrite. (1).
- Park, C., Kim, T.-H., Kim, S., Kim, S.-W., Lee, J., and Kim, S.-H. (2003). Optimization for biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas putida*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(6), 567-571.
- Rahal, A. G., and Moussa, L. A. (2011). Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by Soil Bacteria Isolated From TNT Contaminated Soil. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(2), 8-17.

- Ramos, J. L., González-Pérez, M. M., Caballero, A., and Dillewijn, P. v. (2005). Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3), 275-281.
- Serrano-González, M. Y., Chandra, R., Castillo-Zacarias, C., Robledo-Padilla, F., Rostro-Alanis, M. d. J., and Parra-Saldivar, R. (2018). Biotransformation and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by microbial metabolism and their interaction. *Defence Technology*, 14(2), 151-164.
- Sheibani, G., Naeimpoor, F., and Hejazi, P. (2011a). Screening Effective Factors in Slurry Phase Bioremediation of 2-4-6-TNT Contaminated Soil. *Journal of Hazardous Materials*, 188, 1-9.
- Sheibani, G., Naeimpoor, F., and Hejazi, P. (2011b). Statistical factor-screening and optimization in slurry phase bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 188(1), 1-9.
- Silva, G. A. d., Bernardi, T. L., Schaker, P. D., Menegotto, M., and Valente, P. (2012). Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. *Brazilian archives of biology and technology*, 55(2), 319-327.
- Sisco, E., Najarro, M., Bridge, C., and Aranda, R. (2015). Quantifying the degradation of TNT and RDX in a saline environment with and without UV-exposure. *Forensic Science International*, 251, 124-131.
- Smets, B. F., Yin, H., and Esteve-Nuñez, A. (2007). TNT biotransformation: when chemistry confronts mineralization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(2), 267-277.
- Stenuit, B. A., and Agathos, S. N. (2010). Microbial 2,4,6-trinitrotoluene degradation: could we learn from (bio)chemistry for bioremediation and vice versa? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(5), 1043-1064.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Van, B. N., Nikolaeva, E. V., Shamov, A. G., Khrapkovskii, G. M., and Tsyshevsky, R. V. (2015). Exploration of decomposition pathways of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)

- radical ions by means of density functional theory. *International Journal of Mass Spectrometry*, 392, 7-15.
- Weber, R. W. S., Ridderbusch, D. C., and Anke, H. (2002). 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) tolerance and biotransformation potential of microfungi isolated from TNT-contaminated soil. *Mycological Research*, 106(3), 336-344.
- Whiteway, M., and Bachewich, C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual review of microbiology*, 61, 529-553.
- Williams, R. E., Rathbone, D. A., Scrutton, N. S., and Bruce, N. C. (2004). Biotransformation of Explosives by the Old Yellow Enzyme Family of Flavoproteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3566-3574.
- Wittich, R.-M., Haïdour, A., Van Dillewijn, P., and Ramos, J.-L. (2008). OYE Flavoprotein Reductases Initiate the Condensation of TNT-Derived Intermediates to Secondary Diarylamines and Nitrite. *Environmental Science & Technology*, 42(3), 734-739.
- Yang, Z., Chen, J., Zhou, Y., Huang, H., Xu, D., and Zhang, C. (2018). Understanding the hydrogen transfer mechanism for the biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene catalyzed by pentaerythritol tetranitrate reductase: molecular dynamics simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(17), 12157-12165.
- Zaripov, S. A., Naumov, A. V., Abdrakhmanova, J. F., Garusov, A. V., and Naumova, R. P. (2002). Models of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) initial conversion by yeasts. *FEMS Microbiol Lett*, 217(2), 213-217.
- Ziganshin, A. M., and Gerlach, R. (2014). Pathways of 2,4,6-Trinitrotoluene Transformation by Aerobic Yeasts. In S. N. Singh (Ed.), *Biological Remediation of Explosive Residues* (pp. 301-311). Cham: Springer International Publishing.
- Ziganshin, A. M., Gerlach, R., Borch, T., Naumov, A. V., and Naumova, R. P. (2007a). Production of Eight Different Hydride Complexes and Nitrite Release from 2,4,6-Trinitrotoluene by *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(24), 7898-7905.
- Ziganshin, A. M., Gerlach, R., Naumenko, E. A., and Naumova, R. P. (2010a). Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the yeast strain *Geotrichum candidum* AN-Z4. *Microbiology*, 79(2), 178-183.

- Ziganshin, A. M., Naumov, A. V., Suvorova, E. S., Naumenko, E. A., and Naumova, R. P. (2007b). Hydride-mediated reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by yeasts as the way to its deep degradation. *Microbiology*, 76(6), 676-682.
- Ziganshin, A. M., Naumova, R. P., Pannier, A. J., and Gerlach, R. (2010b). Influence of pH on 2,4,6-trinitrotoluene degradation by *Yarrowia lipolytica*. *Chemosphere*, 79(4), 426-433.

ANEXO

ANEXO 1. Tolerancia de cepas de levaduras a 200-1500 mg/L de TNT

Tabla 12. Tolerancia de 29 cepas de levaduras a TNT.

CEPA	Concentración de TNT (mg/L)			
Código 2	200	500	1000	1500
MDP-A1	5.3	0.8	0.5	0.5
MDP-S1	3.6	2.0	0.5	0.5
MDP-S2	3.5	1.5	0.5	0.5
MD3-A1	4.2	2.8	2.0	1.1
MD3-A2	3.8	3.1	2.8	1.8
MD3-S1	6.3	2.2	2.7	2.5
MDH-A1	4.3	2.9	2.5	1.5
MDH-A2	3.6	1.3	0.5	0.5
MD10-A1	4.1	2.7	2.8	3.2
MD10-A2	3.6	0.8	0.5	0.5
MD10-S1	7.6	1.8	0.5	0.5
MD3-A3	6.1	2.0	0.5	0.5
MD3-A4	5.6	1.5	0.5	0.5
MDP-A2	4.6	3.7	2.3	1.3
M10-A3	8.3	5.6	3.7	2.2
4T-500-1K	2.8	1.6	1.5	0.5
4	4.4	1.6	0.5	0.5
3JSE-500-1MK	2.9	1.6	0.5	0.5
13JA-250-1L	2.9	2.2	0.5	0.5
7TS-500-1	3.0	3.4	2.0	0.5
85	3.0	0.7	0.5	0.5
68	4.6	2.4	2.5	1.5
1TS-500-2K	5.9	1.2	0.5	0.5
9TS-500-1	4.0	3.1	2.3	2.5
8JS-500-1LK	4.2	1.1	0.5	0.5
3JS-500-3LK	3.2	1.3	0.5	0.5
8TS-500Z	5.6	3.1	3.7	2.9
3TA-500-1K	4.3	2.0	1.4	1.6
64	5.0	2.5	3.7	0.5

ANEXO 2. Análisis de producción de nitrito durante la degradación de TNT.

Tabla 13. Análisis ANOVA de respuesta liberación de nitrito durante la degradación de TNT.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Glucosa	0.9653	1	0.9653	0.15	0.7214
B:NH₄Cl	0.1076	1	0.1076	0.02	0.9042
C:Tween 80	0.0710	1	0.0710	0.01	0.9221
D:pH	110.156	1	110.156	17.52	0.0249
E:Inóculo	0.4844	1	0.4844	0.08	0.7994
AB	1.1067	1	1.1067	0.18	0.7031
AC	2.9636	1	2.9636	0.47	0.5417
AD	0.5814	1	0.5814	0.09	0.7809
AE	0.0493	1	0.0493	0.01	0.9350
BC	0.0462	1	0.0462	0.01	0.9371
BD	0.1722	1	0.1722	0.03	0.8791
BE	2.0093	1	2.0093	0.32	0.6114
CD	0.0426	1	0.0426	0.01	0.9396
CE	1.5475	1	1.5475	0.25	0.6539
DE	1.2455	1	1.2455	0.20	0.6864
Error total	18.8656	3	6.2885		
Total (corr.)	140.414	18			

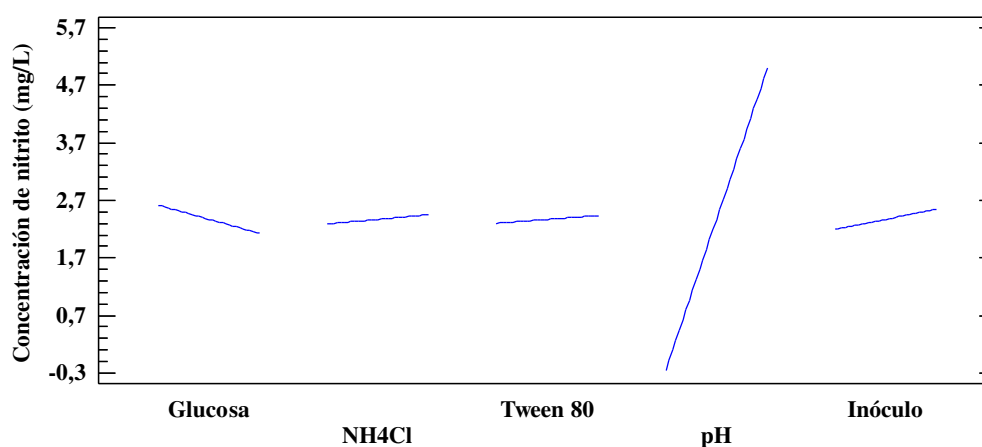


Figura 31. Efectos principales en la liberación de nitrito.

ANEXO 3. Calibración de TNT

Tabla 14. Datos de curva de calibración de TNT.

TNT (mg/L)	\bar{X}	S
2	0.0475	0.005
5	0.157	0.007
10	0.311	0.045
20	0.7355	0.015
40	1.638	0.214

Tabla 15. ANOVA de calibración de TNT

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	F	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1.6735	1.6735	1027.2037	6.67522E-05
Residuos	3	0.0049	0.0016		
Total	4	1.6784			

ANEXO 4. Calibración de ión nitrito

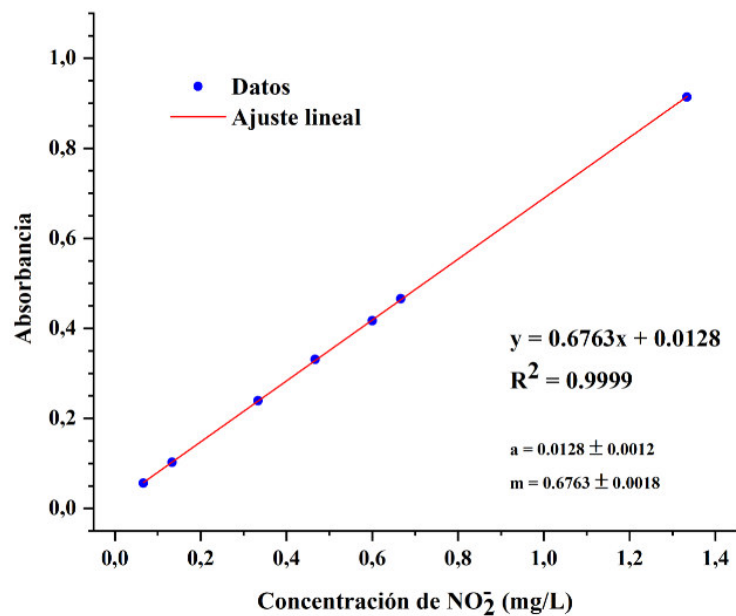


Figura 32. Curva de calibración de nitrito.

NO_2^- (mg/L)	\bar{X}	S
0.0667	0.056	0.010
0.1334	0.103	0.001
0.3334	0.239	0.000
0.4667	0.331	0.005
0.6001	0.417	0.003
0.6667	0.466	0.001
1.3335	0.914	0.019

Tabla 16. ANOVA de calibración de nitrito.

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.4950	0.4950	127966.995	3.2398E-12
Residuos	5	1.9342E-05	3.86834E-06		
Total	6	0.4950			